

**Effekte von
PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten auf
die kardiovaskuläre Differenzierung von murinen
embryonalen Stammzellen *in vitro***

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. Biol. Constance Danzer
geboren am 22.01.1981 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. Maria Wartenberg
2. Prof. Dr. Stefan Lorkowski
3. PD Dr. Alexander Kleger

Tag der öffentlichen Verteidigung:

05.02.2015, Jena

IM GEDENKEN AN SIEGLINDE SCHMIDT &

GROSSEN DANK AN MEINE FAMILIE...

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung	XI
Abstract	XIII
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Hintergrund	- 1 -
1.2 Das kardiovaskuläre System.....	- 1 -
1.3 Differenzierung durch reaktive Sauerstoffspezies	- 3 -
1.4 Die Stammzelle als Modell für die embryonale Entwicklung	- 5 -
1.5 Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR)-Familie	- 6 -
1.5.1 Struktur und Wirkungsweise der PPARs.....	- 6 -
1.5.2 Funktion und Vorkommen der PPARs	- 9 -
1.5.2.1 PPAR- α	- 10 -
1.5.2.2 PPAR- β/δ	- 10 -
1.5.2.3 PPAR- γ	- 11 -
1.5.3 Natürliche Liganden der PPARs.....	- 11 -
1.5.4 Synthetische Liganden von PPAR- γ	- 12 -
1.5.4.1 Agonisten der PPAR- γ und ihre Wirkung	- 13 -
1.5.4.2 Antagonist der PPAR- γ	- 14 -
2 Zielstellung	- 16 -
3 Material und Methoden	- 18 -
3.1 Methoden	- 18 -
3.1.1 Zelllinien.....	- 18 -
3.2 Zellkultur.....	- 19 -
3.2.1 Einfrieren, Auftauen und Passagieren	- 19 -
3.2.2 Spinnerflaschenkultur	- 20 -
3.3 Inkubation der embryoid bodies mit PPAR- γ -Liganden	- 20 -
3.4 Messung der Kontraktionen.....	- 21 -
3.5 Scratch-Migrations-Assay	- 21 -
3.6 Zellzahlbestimmung	- 22 -
3.7 Durchflusszytometrische Messung.....	- 23 -
3.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	- 24 -
3.8.1 Letalitätsnachweis mittels Ethidiumhomodimer-2	- 24 -
3.8.2 Messung von Stickstoffmonoxid	- 25 -
3.8.3 Messung von freien intrazellulären Sauerstoffradikalen	- 25 -
3.8.4 Immunfluoreszenz	- 26 -

3.9	<i>Proteindetektion mittels Western Blot</i>	- 27 -
3.9.1	Probennahme und Proteinbestimmung	- 27 -
3.9.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS)-PAGE	- 28 -
3.9.3	Auswertung am LAS-3000 Lite	- 29 -
3.9.4	Strippen der Membran	- 29 -
3.10	<i>Quantitative real time RT-PCR</i>	- 30 -
3.10.1	Isolierung der mRNA	- 30 -
3.10.2	cDNA-Synthese.....	- 30 -
3.10.3	Quantitative <i>real time RT-PCR</i>	- 31 -
3.11	<i>Statistische Auswertung</i>	- 32 -
4	Ergebnisse	- 33 -
4.1	<i>Charakterisierung der ES-Zelllinie und deren Differenzierung zu unterschiedlichen Zelltypen in der EB-Kultur</i>	- 33 -
4.1.1	Mesodermale Entwicklung während der EB-Entwicklung	- 33 -
4.1.2	Endotheliale Differenzierung während der EB-Entwicklung	- 35 -
4.1.3	Differenzierung der glatten Muskulatur während der EB-Entwicklung.....	- 36 -
4.1.4	Altersabhängige Expressionen von <i>PPAR-α, -β/δ, -γ</i>	- 37 -
4.2	<i>Einfluss von PPAR-γ-Liganden auf die EB-Entwicklung</i>	- 38 -
4.2.1	Untersuchung der Zytotoxizität der PPAR- γ -Liganden	- 38 -
4.2.2	Einfluss der PPAR- γ -Liganden auf die Proliferation und Migration der differenzierten Zellen im EB.....	- 40 -
4.2.3	Größenveränderung der EBs während der Kultivierung	- 43 -
4.2.4	Einfluss der PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten auf die Expression der PPARs ..	- 45 -
4.2.5	Effekt der PPAR- γ -Liganden auf Flk1 ⁺ -Zellen	- 46 -
4.2.6	Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die Kardiomyogenese.....	- 46 -
4.2.6.1	Untersuchung der kontrahierenden "embryoid bodies"	- 47 -
4.2.6.2	Produktion freier Sauerstoffradikale.....	- 50 -
4.2.6.3	Nachweis früher kardialer Gene	- 52 -
4.2.7	Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die vaskuläre Differenzierung im EB.....	- 55 -
4.2.7.1	Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die endotheliale Differenzierung	- 55 -
4.2.7.2	Generierung von Stickstoffmonoxid nach Behandlung mit PPAR- γ -Liganden-	- 58 -
	-	
4.2.7.3	Einfluss von Alkohol auf die <i>PPAR</i> -Expression und Endothelzellen im EB ..	- 59 -
4.2.7.4	Effekt der PPAR- γ -Liganden auf die Differenzierung der glatten Muskulatur im EB	- 61 -
5	Diskussion	- 64 -
5.1	<i>Charakterisierung der "embryoid bodies"</i>	- 64 -
5.2	<i>Wirkung der PPAR-γ-Liganden auf mES-Zellen</i>	- 66 -
5.3	<i>Klinischer Aspekt & Ausblick</i>	- 77 -
5.4	<i>Zusammenfassende Interpretation der gesetzten Zielstellungen</i>	- 78 -
6	Literaturverzeichnis	- 80 -
7	Bildverzeichnis	- 92 -
8	Material	- 94 -
8.1.1	Verbrauchsmaterial.....	- 94 -
8.1.2	Geräte	- 95 -
8.1.3	Substanzen.....	- 97 -
8.1.4	Antikörper.....	- 100 -

8.1.5 Oligonukleotide	- 101 -
8.1.6 Lösungen und Medien	- 101 -
Eidesstattliche Erklärung.....	i
Lebenslauf	ii
Wissenschaftliche Beiträge.....	iii

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Adenin
A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
ACE	<i>"angiotensin converting enzyme"</i>
AF-1/2	konstitutive Aktivierungsfunktion-1/2
AK	Antikörper
Akt	<i>"serine-threonine protein kinase"</i>
ANG II	Angiotensin II
AT ₁ R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT ₂ R	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
α -SMA	<i>"α-smooth muscle actin"</i>
APT	2-Azetylphenothiazin (ML171)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
AU	<i>"arbitrary units"</i>

B

bp	Basenpaare
bpm	<i>"beats per minute"</i>
BSA	<i>"bovine serum albumin"</i>

C

C	Cytosin
CD	<i>"cluster of differentiation"</i>
CGZ	Ciglitazon
cDNA	<i>"copy deoxyribonucleic acid"</i>
cKit	<i>"stem cell factor receptor"</i> , Rezeptor-Tyrosin-Kinase
cLSM	<i>konfokale Laser Scanning Microscopy</i>
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diacetat
C _t	<i>"cycle threshold"</i>
Cy	Carbocyanin
Cys	Cystein

D

DAF-FM Diacetat	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetat
DBD	DNA-bindende Domäne
DCF	Dichlorofluorescein
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>"deoxyribonucleic acid"</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPI	Diphenyliodonium
DTT	Dithiothreitol

E

EB	“embryoid body“
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	“mouse Na ⁺ channel“
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EST	“embryonic stem cell test“
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
ErbB2/ErbB3	“epidermal growth factor receptor”2, (HER2)/3 (HER3)
ERK	extrazellulär regulierte Kinase

F

FBS	“fetale bovine serum“
FGF	“fibroblast growth factor“
flk1	“fetal liver kinase 1“, s. KDR, VEGFR2
flt1	“fms-like tyrosine kinase 1“, s. VEGFR1
FS	Fettsäure

G

G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glut-4	Glukosetransportprotein-4
GMEM	“Glasgow minimal essential medium“
GW	Glaxo Wellcome
GW9662	2-Chloro-5-Nitro-N-Phenylbenzamid
Gy	Gray

H

h	Stunde
HCN4	“hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 gene“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ DCFDA	2',7' Dichlorodihydro-Fluorescein Diacetat
HIF-1 α	“hypoxia-inducible factor-1 α “
HPI-Puffer	Homogenisierungspuffer
HRE	“hormone-response element“
HRP	“horseradish peroxidase“
hsp	“heat shock protein“
HUVEC	“human umbilical vein endothelial cells“

I

ICM	“inner cell mass“
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
IGF	“insulin-related growth factors“
IRES	“internal ribosome entry site“
<i>isl1</i>	“LIM-homeobox transcription factor1“, „insulin gene enhancer protein“

K

kDa	Kilodalton
ki67	Kiel 1967
KDR	“kinase insert domain receptor“, s. VEGFR-2, Flk1

L

LAS	<i>Luminescence Image Analyse System</i>
LBD	Ligandenbindende Domäne
LIF	leukämieinhibierender Faktor

M

M.	<i>Musculus</i>
mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen (mESC)
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
mpkCCD _{c14} cell	“mouse cortical collecting duct cell line”
mRNA	“messenger” RNA
Ms	Maus
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert

N

NAD(P)H	<i>Nicotinamidadenindinukleotid (phosphat)</i>
NEAA	“nonessential amino acids”
nm	Nanometer
NMPG	N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin
Nkx2.5	Nk 2 Homeoboxprotein 5/“cardiogenic homeodomain factor”,
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
NSADs	“non-steroidal anti-inflammatory drugs”

O

OCTOPUS	“Optical Coherence Tomography to Evaluate Paclitaxel-Eluting Balloons and Everolimus -Eluting Coronary Stents“
OD	optische Dichte

P

PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAO	Phenylarsinoxid
PAT5A	[5-[4-[N-(2-pyridyl)-(2S)-pyrrolidin-2methoxyl]phenylmethylen [thiazolidin-2,4-dion
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDGF	<i>"platelet-derived growth factor"</i>
PECAM-1	<i>"platelet endothelial cell adhesion molecule"</i> -1 (CD31)
15-PGJ2d	15-deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J2
PFA	Paraformaldehyd
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI	Propidium Iodide
PPAR	<i>"peroxisome proliferator activated receptor"</i>
PPRE	<i>"peroxisome proliferator response element"</i>
PS	Petrischale

R

Rb	<i>"rabbit"</i>
RAR	<i>"retinoic acid receptor"</i>
RGZ	Rosiglitazon
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinacid
ROS	<i>"reactive oxygen species"</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>"real time-polymerase chain reaction"</i>
RXR	<i>"retinoid X receptor"</i>

S

s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler, <i>"standard error of mean"</i>
SF	Spinnerflasche
shRNA	<i>"small hairpin RNA"</i>
SMA	<i>"smooth muscle actin"</i>
SMC	<i>"smooth muscle cells"</i>
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
SPA	<i>"scintillation proximity assay"</i>

T

T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>tbx5</i>	<i>T-Box 5 Gen</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>"tissue growth factor"</i>
Trolox	(\pm)-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-Tetramethylchromane-2
TZD	Thiazolidindion

U

U	<i>Unit</i>
ü. N.	über Nacht

V

V.	<i>Vena</i>
V	Volt
VAS2870	1,3-Benzoxazol-2-yl-3-benzyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-

VEGF	d]pyrimidin-7-yl-Sulfid
VEGFR1/2	“ <i>vascular endothelial growth factor</i> “
VSMC	“ <i>vascular endothelial growth factor receptor 1/2</i> “
	“ <i>vascular smooth muscle cells</i> “

W

WHO	<i>world health organisation</i>
-----	----------------------------------

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Zeitliches Auftreten embryonaler kardiovaskulärer Marker <i>in vitro</i>	-2-
Abb. 1-2: Strukturen der Kernhormonrezeptore.....	-7-
Abb. 1-3: Kernrezeptor-Superfamilie.....	-8-
Abb. 1-4: PPAR-Familie: Liganden, Rezeptoren, Gewebespezifität und Wirkung	-9-
Abb. 1-5: Chemische Struktur der Glitazone	-13-
Abb. 1-6: Synthetischer Antagonist/Inhibitor für PPAR- γ	-15-
Abb. 3-1: Schematische Darstellung der mES-Zellkultur	-21-
Abb. 3-2: Schematische Darstellung des <i>Scratch-Migrations-Assays</i>	-22-
Abb. 3-3: Schematische Darstellung der Zellzahl-Messung	-23-
Abb. 3-4: Histogramm einer durchflusszytometrischen Messung	-23-
Abb. 4-1: Altersabhängige Flk1 ⁺ -GFP-Fluoreszenz während der E14Tg2a.4 EB-Entwicklung	-34-
Abb. 4-2A/B: Altersabhängige Synthese von CD31 während der EB-Entwicklung ..	-35-
Abb. 4-3 A: Altersabhängige Synthese von α -SMA während der EB-Entwicklung...	-36-
Abb. 4-3 B: Immunfluoreszenz von α -SMA während der EB-Entwicklung	-39-
Abb. 4-4: Relative PPAR mRNA-Expression während der EB-Entwicklung	-38-
Abb. 4-5 A/B: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Vitalität der ES-Zellen	-39-
Abb. 4-6: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Apoptose im EB	-40-
Abb. 4-7: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Migration differenzierter Zellen.....	-41-
Abb. 4-8: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Proliferation der Zellen im EB.....	-42-
Abb. 4-9: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Zellzahl der CGR8-Einzelzellen	-43-
Abb. 4-10: Größenveränderung der <i>embryoid bodies</i> (μ m)	-44-
Abb. 4-11: Prozentuale PPAR-Gen-Expression nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden	-45-
Abb. 4-12: Flk1-Synthese während der embryonalen Entwicklung.....	-46-
Abb. 4-13: Anzahl der kontrahierenden EBs nach Inkubation mit PPAR- γ -Agonisten.....	-47-
Abb. 4-14: Frequenz der Kontraktionen (Schläge/Minute) in den inkubierten EBs ...	-48-
Abb. 4-15: Frequenz der Kontraktionen (Schläge/Minute) nach der Inkubation mit PPAR- α und PPAR- γ Liganden.....	-49-
Abb. 4-16 A/B: ROS-Generierung nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden	-50-
Abb. 4-16 C/D: ROS-Generierung nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden	-51-
Abb. 4-17: ROS-Generierung nach PPAR- γ - und PPAR- α -Liganden.....	-52-
Abb. 4-18: Prozentuale mRNA-Expression der embryonalen kardialen Gene	-53-
Abb. 4-19: Effekte der PPAR- γ -Liganden auf <i>hcn4-</i> und α -Aktinin-Synthese.....	-54-
Abb. 4-20: Quantitative Auswertung der CD31 ⁺ -Fläche	-56-
Abb. 4-21: Einfluss der PPAR- γ -Liganden auf die vaskuläre Differenzierung im EB	-57-
Abb. 4-22: NO-Bildung nach Behandlung mit PPAR- γ -Liganden	-58-
Abb. 4-23: Relative mRNA-Expression der PPARs nach Alkoholbehandlung	-60-
Abb. 4-24: Alkoholeffekte auf die Differenzierung von Endothelzellen	-60-
Abb. 4-25: Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die Ausbildung der glatten Muskulatur.....	-61-
Abb. 4-26: Repräsentative α -SMA ⁺ -Immunfluoreszenz	-62-
Abb. 5-1: Embryonale Entwicklung der Maus.....	-66-
Abb. 5-2: Zusammenfassung der Ergebnisse von Ciglitazon und GW9662 auf die Proliferation und Migration	-69-
Abb. 5-3: Übersicht der Ergebnisse nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden auf die kardiale Differenzierung in mES-Zellen	-71-
Abb. 5-4: Zusammenhang zwischen den PPARs und der kardialen Differenzierung.....	-73-
Abb. 5-5: Zusammenfassung der Ergebnisse der verwendeten PPAR- γ -Liganden auf die endotheliale Differenzierung, vor allem NO-Generierung, CD31 und α -SMA	-74-
Abb. 5-6: Zusammenhang von der PPAR- γ -Aktivierung und Inhibierung.....	-75-
Abb. 5-7: Schematische Zusammenfassung, der aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse.....	-79-

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verteilung der Konzentrationen der PPAR- γ -Aktivatoren und /-Inhibitoren	- 20 -
Tab. 2: Verwendete Verdünnung von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen	- 27 -
Tab. 3: Verwendete <i>SDS</i> -Gele.....	- 28 -
Tab. 4: Verwendete Western Blot Antikörper.....	- 29 -
Tab. 5: Ansatz für Mastermix.....	- 30 -
Tab. 6: Zusammensetzung des Mastermixes für die quantitative <i>real time RT-PCR</i>	- 31 -
Tab. 7: Reaktionsbedingungen für die quantitative <i>real time RT-PCR</i> am Qiagen Rotor-Gene.....	- 32 -

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der "*peroxisomen proliferator activated receptor- γ* " (PPAR- γ)-Liganden auf die kardiovaskuläre Differenzierung in murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) untersucht.

Als ideales *in vitro*-Modell zur Analyse der Kardiovaskulogenese wurde der "*embryoid body*" (EB) etabliert (Spielmann *et al.*, 1997), womit er sich zur Wirkungsuntersuchung von PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten auf die kardiovaskuläre Differenzierung eignet (Rosenson *et al.*, 2012). Die vorgestellten Ergebnisse dienen zum einen der Charakterisierung der mES-Zellen und zum anderen der Beschreibung der Effekte von PPAR- γ -Liganden auf die Entwicklung der glatten Muskulatur, des Endothels und der Kardiomyozyten. Unsere Daten zeigten ein streng ablaufendes Muster der kardiovaskulären Protein- und Genexpression im EB. Die Synthese von "*fetal liver kinase 1*" (Flk1), dem Schlüsselmolekül während der Differenzierung mesodermaler Zellen (Hannig *et al.*, 2010), beginnt am Tag 3, dabei präsentierte sich am Tag 5 eine maximale Hochregulation. Wir dokumentierten weiterhin, dass einen Tag später die Expression des Endothelmarkers CD31 einsetzt. Die Differenzierung der glatten Muskulatur erfolgte zeitlich versetzt, beginnend am Tag 8 und erreichte das Maximum am Tag 12. Die Entstehung bzw. das Einsetzen spontaner Kontraktionen der Kardiomyozyten konnte ab Tag 8 beobachtet werden (Hescheler *et al.*, 2002). Parallel zu den beschriebenen Expressionsmustern regulierte die untersuchte Zelllinie die verschiedenen Isoformen der PPARs: PPAR- α , - β/δ , - γ hoch, was deren Beteiligung an den Entwicklungsprozessen nahelegt. Die anschließende Inkubation mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten sollte Aufschluss über die Beteiligung von PPAR- γ auf die Kardiovaskulogenese geben. Die Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten Ciglitazon verursachte in mES-Zellen eine Reduktion der endothelialen Zellen und der Kardiomyozyten. Somit inhibiert die Aktivierung des PPAR- γ die Herz-Kreislauf-Entwicklung, wohingegen die Differenzierung der glatten Muskulatur positiv beeinflusst wird. Die Stimulation der mES-Zellen mit GW9662, einem spezifischem PPAR- γ -Antagonisten, zeigte eine Effektsteigerung auf die "*reactive oxygen species*" (ROS)-Generierung und damit auf die Kardiomyogenese. Des Weiteren erhöhte die Inhibierung der PPAR- γ die Bildung von endothelialen Strukturen, störte aber die Genese der glatten Muskulatur.

Die vorliegende Arbeit kann damit entscheidende Wirkungsmechanismen von PPAR- γ -Liganden auf die kardio- als auch auf die vaskulogenetischen Prozesse erklären. Zudem

verdeutlicht die Inkubation mit PPAR- γ -Agonisten im *in vitro*-Modell das Scheitern von Thiazolidindion (TZD)-basierter Medikamente aufgrund von Herzversagen.

Abstract

In this study we analysed the effects of peroxisomen proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)- ligands on the cardiovascular differentiation of murine embryonic stem (mES) cells.

As an optimal *in vitro*-model for the analysis of cardiovascular genesis the embryoid bodies (EBs) was established (Spielman *et al.*, 1997). Thus, the EB is suitable for studying the effect of PPAR- γ -ligands on cardiovascular differentiation (Rosenson *et al.*, 2012). Our results documented the properties of the stem cell line and furthermore, the influence of PPAR- γ -agonists and -antagonists on the development of smooth muscle cells (SMC), cardiomyocytes and endothelial cell differentiation. The characterisation of the EB differentiation revealed a strict time dependent patterning of cardiovascular protein and gene expressions. The synthesis of fetal liver kinase 1 (Flk1), which is the key molecule during the differentiation of mesodermal-derived cells (Hannig *et al.*, 2010), starts at day three and increases until day five. Our results demonstrated that the expression of the endothelial marker CD31 was induced at the following days with a peak in day 5 old EBs. Smooth muscle cells began to differentiate at day 8 with a peak at day 12. We observed the development of cardiomyocytes in the *in vitro*-model and their spontaneous beating at day 8 (Hescheler *et al.*, 2002). Furthermore, the different isoforms of PPARs (PPAR- α , - β/δ , γ) were expressed during the developmental process of EBs. The following incubation with PPAR- γ -agonist and -antagonists should prove the involvement of the PPAR- γ in cardiovascular differentiation. Therefore, ciglitazone (CGZ) as a PPAR- γ -agonist induced a down regulation of endothelial cell differentiation (CD31⁺ cells) and differentiated cardiomyocytes. As a consequence the inhibition of the cardiovascular system by the activation of PPAR- γ was observed, but on the other hand, we could show that CGZ had a positive effect on the smooth muscle differentiation. However, the specific PPAR- γ -antagonist, GW9662 stimulated the reactive oxygen species (ROS) generation, what is associated with the cardiomyogenesis. Additionally, the inhibition of PPAR- γ by GW9662 caused the development of endothelial but disturbed the genesis of smooth muscle cells.

In summary, we could explain the connection between the PPAR- γ and the cardio- and vasculogenic development. We could clarify by the incubation with PPAR- γ -agonists in our *in vitro*-model the failure of a thiazolidindione (TZD)-based therapy and the resulting heart problems.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die *world health organisation* (WHO) dokumentierte 2008 mehr als 17 Mio. Todesfälle durch kardiovaskuläre Krankheiten (Mendis *et al.*, 2011), womit Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den weltweit häufigsten Todesursachen zählen. Als Posttherapiemöglichkeit wird der Einsatz sowohl adulter als auch embryonaler Stammzellen zur Regeneration von Kardiomyozyten und koronaren Gefäßen diskutiert (Li *et al.*, 2009). Deshalb ist es von essenzieller Bedeutung, im Rahmen der Grundlagenforschung die Herzentwicklung *in vitro* und *in vivo* zu erforschen. Mit dem *in vitro*-Modell "embryoid body" (EB) ist es möglich, die Schritte der Embryogenese und deren Differenzierungs- und Wachstumsprozesse im Detail zu untersuchen, da sich dessen Zellen spontan zu allen drei Keimblättern entwickeln (Wobus *et al.*, 1997, Wobus und Boheler, 2005). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit mES-Zellen hinsichtlich der Rolle von PPAR- γ -Liganden auf die kardiovaskuläre Differenzierung untersucht

1.2 Das kardiovaskuläre System

Das kardiovaskuläre System setzt sich aus dem Herzen (lat. *cardia*) und den Blutgefäßen (lat. *vasa*) zusammen. Das Herz-Kreislauf-System, ist das erste Organsystem der Vertebraten, welches während der embryonalen Entwicklung angelegt wird. Es dient zur Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff schon während der frühen Phase der Embryogenese. Die mesodermalen Progenitorzellen differenzieren sich im Laufe der Embryonalentwicklung zu Hämangioblasten, welche sich zu endothelialen Vorläuferzellen oder hämatopoetischen Stammzellen weiterentwickeln (Kopp *et al.*, 2004).

Die embryonale Vaskulogenese beginnt im Dottersack mit der Bildung von Blutinseln, welche aus einem zentralen, von hämatopoetischen Stammzellen gebildeten Bereich und einer peripheren Zone endothelialer Vorläuferzellen (Angioblasten) aufgebaut sind (Risau, 1997). Während der Entwicklung des murinen Herzens wandern Progenitorzellen aus der kardiogenen Zone aus und bilden am Tag E8 den tubulären Herzschlauch (Buckingham *et al.*, 2005). Nachdem sich am Tag E9 die großen Hauptgefäße, wie die V. cavae und die Aorta, zu einem geschlossenen Blutkreislaufsystem entwickelt haben, beginnen die Blutzirkulation sowie die Differenzierung der glatten Muskulatur vom z. B. Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt (McHugh, 1995). Die kardiovaskulären Differenzierungsprozesse können während der Embryogenese *in vivo* mit dem von uns verwendeten *in vitro*-EB-Modell verglichen werden. Im EB-System konnten kardiogene Flk1⁺-Progenitorzellen zeitabhängig nachgewiesen werden

(Bartsch *et al.*, 2011). Aus diesen Flk1⁺-Progenitorzellen können sich im Laufe der EB-Kultur sowohl endotheliale als auch kardiale Zellen bilden (Iida *et al.*, 2005) (Abb. 1-1).

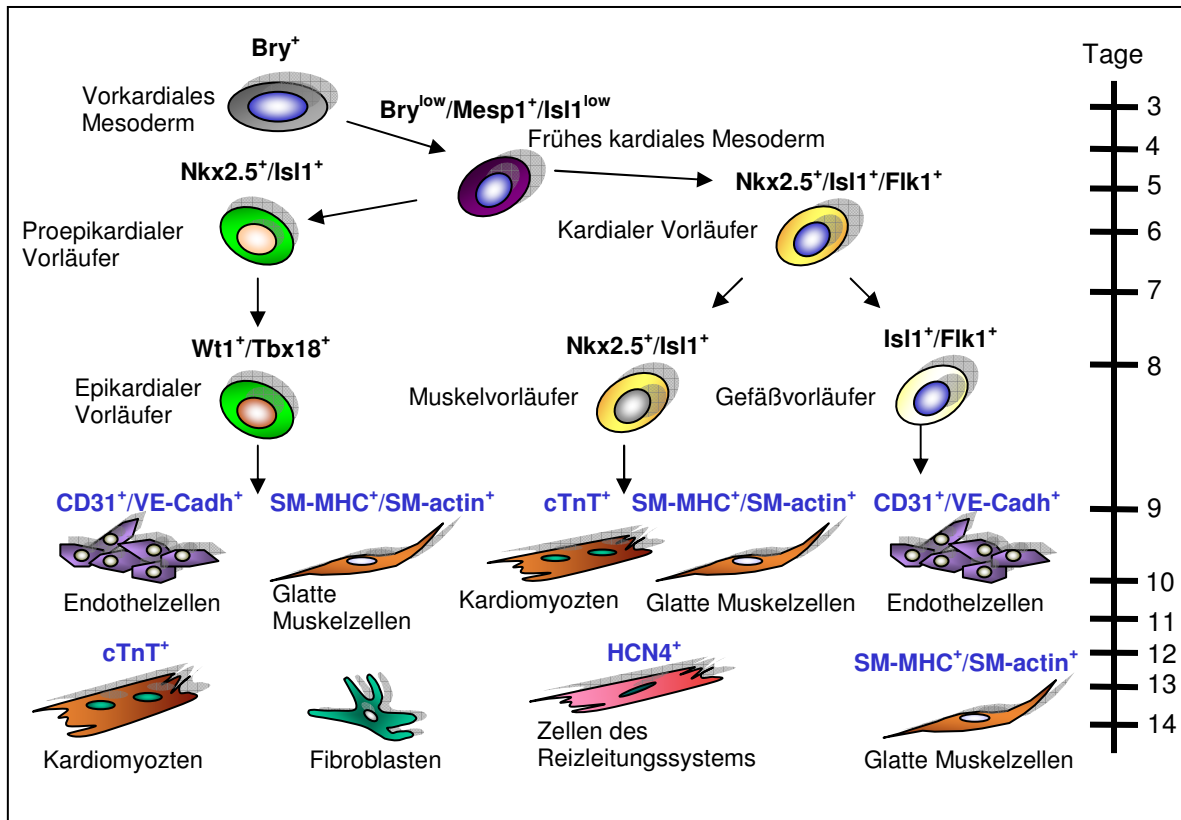


Abb. 1-1: Zeitliches Auftreten embryonaler kardiovaskulärer Marker *in vitro*

Die Expression der embryonalen Marker in ES-Zellen folgt einem strengen Muster. Hierbei entstehen aus dem vorkardialen Mesoderm Bry⁺-ES-Zellen, nachfolgend werden Gene für das frühe kardiale Mesoderm wie *nkx2.5*⁺, *isl1*⁺, *flk1*⁺-Zellen an den Tagen 3 – 8 differenziert. Aus den *nkx2.5*⁺- und *isl1*⁺-Muskelvorläuferzellen bilden sich die *hcn4*⁺-Herzmuskelzellen sowie *aSMA*⁺-glatte Muskelzellen sind. Zudem können sich aus den *nkx2.5*⁺- und *flk1*⁺-Gefäßvorläuferzellen die CD31⁺-Endothelzellen und *aSMA*⁺-Muskelzellen differenzieren. (modifiziert nach Jezierski 2007; Kattman, 2007, Bartsch *et al.* 2011, Lam *et al.*, 2009)

Für die Bildung des kardiovaskulären Systems sind u. a. der Homeobox-Transkriptionsfaktor "cardiogenic homeodomain factor" (*nkx2.5*) (Nemer *et al.*, 2008) und der "T-box transcription factor" (*tbx5*) (Li *et al.*, 1997) sowie "reactive oxygen species" (ROS) für die Kardiogenese (Sharifpanah *et al.*, 2008) von essenzieller Bedeutung. Die Entstehung der Progenitorzellen des sekundären Herzfeldes wird durch das LIM-Homeoboxprotein "insulin gene enhancer protein" (*Islet1*, *Isl1*) bestimmt (Cai *et al.*, 2003). Die Schrittmacherzellen sind Bestandteil des Myokards und des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems welches, ausgehend vom Sinusknoten, die elektrischen Signale über den AV-Knoten zu den Purkinjen-Fasern leitet und somit die Kontraktionen des Herzens antreiben. Diese Zellen werden anhand des "hyperpolarization-activated,

cyclic nucleotide-gated cation channel“ (HCN4-Kanals) detektiert und verursachen die Generierung des Schrittmacherpotentials. Ebenso kann HCN4 den Herzrhythmus sowie die kardiale Entwicklung steuern (Kleger *et al.*, 2010). Die Erregungsleitung aktiviert die aus den Kardiomyozyten bestehende Herzmuskulatur. Charakteristisch für deren Zellen ist ihre Querstreifung, als spezifisches Markerprotein dient α -Aktinin (Sassoon *et al.*, 1988) (Abb. 1-1).

Die Blutgefäße bestehen im Wesentlichen aus Endothel (*Tunica intima*), glatter Muskulatur und elastischen Fasern (*Tunica media*) sowie aus Kollagenfasern (*Tunica adventitia*) (Risau und Flamme, 1995). Das Endothel, welches als spezifisches Markerprotein den *”cluster of differentiation”* 31 (CD31) exprimiert, kleidet die Blut- und Lymphgefäßinnenwand aus (Iida *et al.* 2005). Zudem dient CD31, auch *”platelet endothelial cell adhesion molecule-1”* (PECAM-1) genannt, als intervaskulärer Oberflächenmarker während der Leukozytendiapedese (Reitsma *et al.*, 2007). Die endothelialen Zellen liegen der Basallamina in der Regel als einschichtiges Plattenepithel auf und regulieren den Blutdruck und Gefäßtonus über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) (Sauer *et al.*, 2008).

Die glatte Muskulatur, ein weiterer Bestandteil des Herz-Kreislauf-Systems, wird außerdem in mehreren Organen (z. B. Blutgefäßen, Gallenblase, Magen-, Urogenital- und Darmtrakt, Luftwege) (McHugh *et al.*, 1995) sowie im Zytoplasma von Perizyten gebildet (Skalli *et al.*, 1989). Es werden vier Muskelaktintypen unterschieden: das α -Skelettaktin (α -SKA), α -Herzaktin (α -CAA), *” α -smooth muscle actin”* (α -SMA) sowie die *” γ -smooth muscle actin”* (γ -SMA) (Clément *et al.*, 2007). Dabei divergieren die Isoformen der glatten Muskulatur in ihrer Gewebelokalisation, als Marker für die glatte Muskulatur dient α -SMA in dieser Arbeit. (Ng *et al.*, 1997, Clément *et al.*, 2007). Die Kontraktionen der glatten Muskulatur im funktionellen Synzytium können durch die spontane Depolarisation von Schrittmacherzellen erzeugt werden (Katz, 1992).

1.3 Differenzierung durch reaktive Sauerstoffspezies

Die Freisetzung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) findet im lebenden Organismus bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie der zellulären Differenzierung statt (Babior, 2000). Andererseits spielt die Generierung von ROS auch im Zusammenhang mit oxidativem Stress oder Hypoxie der Zellen eine wichtige Rolle und ist damit in den Mechanismus der zellulären Schädigung involviert (Babior, 2000). Hierbei können die ROS als intrazelluläre Signalmoleküle und bei der Regulierung der Zellfunktion dienen

(Denu und Tanner, 1998). Bei den ROS handelt es sich um hochreaktive Moleküle, welche sich aus molekularem Sauerstoff ableiten. Zudem existieren freie Radikale, welche ein oder mehrere unpaare Elektronen besitzen wie Stickstoffmonoxid (NO^\bullet), Hydroxylradikale (HO^\bullet) und Superoxidanion (O_2^-) (Babior, 2000). Ebenso gibt es freie Radikale ohne freie Elektronen, wie hyperchlorische Säure (HOCl), Peroxynitrit (ONOO^-) und Hydrogenperoxid (H_2O_2) (Gryglewski *et al.*, 1986). Die Bildung der ROS erfolgt durch verschiedene Enzymsysteme, wie die NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat)-Oxidase (NOX) (Rossi und Zatti, 1964), die mitochondriale Elektronentransportkette (Boveris und Chance, 1973), die Xanthinoxidase (Fridovich, 1970), die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) (Heinzel *et al.*, 1992).

Im folgenden Abschnitt sollen die für die Kardio- und Angiogenese wichtigen Enzyme der ROS-Generierung NOX und NOS beschrieben werden (Li *et al.*, 2006, Sauer *et al.*, 2008). Innerhalb der NADPH-Oxidase (NOX)-Multienzymkomplexe sind sieben Isoformen bekannt (Nox1 -5 und Duox1 sowie Duox2), die sich aus regulatorischen und katalytischen Untereinheiten zusammensetzen (Babior, 1999). Die regulatorischen Untereinheiten, welche im Zytosol liegen, werden aus zwei Organisations-(p47^{phox}, NOXO1 (NOX Organisator 1)) und zwei Aktivierungsuntereinheiten (p67^{phox}, NOXA1 (NOX Aktivator 1)) sowie aus p22^{phox}, p40^{phox} und den kleinen GTPase-Proteinen Rac1 und Rac2 gebildet (Babior, 1999). Sie katalysieren die Reaktion des Substrates NADPH zum Superoxidanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) mittels der Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff (Babior, 1999). Die so generierten freien ROS können während physiologischer Prozesse, wie bei der Differenzierung und Proliferation, als "second messenger" dienen (Bartsch *et al.*, 2011) und sind damit u. a. maßgeblich an der Kardiomyogenese beteiligt (Sharifpanah *et al.*, 2008). Es wurden bisher vier Isoformen der NOS beschrieben (nNOS, mtNOS, iNOS und eNOS), welche die Guanidin-Gruppe vom L-Argenin in Anwesenheit von Sauerstoff zu NO und L-Citrullin oxidieren (Andrew und Mayer, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde im speziellen die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) untersucht. Sie wurde v. a. als zellmembranständig identifiziert, konnte aber auch in Mitochondrien und im Zellkern nachgewiesen werden (Bredt und Snyder, 1990). Durch ihre Lage an der Innenseite der Blutgefäße spielt sie eine entscheidende Rolle in der Regulation des Blutdrucks (Sauer *et al.*, 2008). Zudem können die ROS, welche durch die NOS generiert werden, Transkriptionsfaktoren, wie den "hypoxia inducible factor" (HIF) und somit die Genexpression, vom angiogenem "vascular endothelial growth factor" (VEGF)

hochregulieren. Damit lassen sich der Einfluss und die Bedeutung der NOS in Bezug auf die angiogenetischen Prozesse erklären (Forsythe *et al.*, 1996).

1.4 Die Stammzelle als Modell für die embryonale Entwicklung

Schon die Zygote ist eine embryonale Stammzelle (ES-Zelle) und weist in den frühen Stadien der Embryogenese Totipotenz auf, d.h., aus ihr kann ein kompletter Organismus gebildet werden. Im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung und nach mehreren Zellteilungen haben ES-Zellen die Fähigkeit, sich zu verschiedenen Gewebetypen des Organismus zu differenzieren. Sie können alle drei Keimblätter ausbilden: das Ekto-, das Endo- und das Mesoderm, weshalb die ES-Zellen während des Blastozystenstadiums (3 -4 Tage nach der Befruchtung der murinen Oozyte) als pluripotent bezeichnet werden (Schlafke und Enders, 1963). Aufgrund dieser Eigenschaften etablierten sich ES-Zellen zu einem wichtigen *in vitro*-Testsystem für die Embryonalentwicklung bzw. Entstehung von spezifischen Gewebetypen und assoziierten pathogenen Prozessen (Wobus und Boheler, 2005).

Zur optimierten Nutzung dieser Zellen etablierten Spielmann *et al.* (1997) den EB als anerkanntes Testverfahren "*embryonic stem cell test*" (EST), welches durch das *European Center for Validation of Alternative Methods* als potentielle Alternative zu Tierversuchen und zur Untersuchung von embryo- und zytotoxischen Substanzen empfohlen wurde (Wobus und Boheler, 2005). Zudem weist der EB als dreidimensionales Zellaggregat die für ein Modellsystem notwendigen Eigenschaften auf: Kultivierbarkeit und eine hohe Teilungsrate. Die Isolierung und Kultivierung von ES-Zellen aus der Mausblastozyste (~ 64 - 200 Zellen) wurde von Evans und Kaufmann im Jahr 1981 erstmals beschrieben. Zur Generierung von EBs stehen verschiedene Kultivierungsprotokolle zur Verfügung:

- a) auf Petrischalen in Massenkultur (Doetschman *et al.*, 1985),
- b) als Methylzellulose-Kultivierung (Wiles und Keller, 1991),
- c) im hängenden Tropfen (Wobus *et al.*, 1997) und
- d) in Spinnerflaschen (SF) als Suspensionskultur (Wartenberg *et al.*, 1998).

In unserer Arbeit wurde die von Wartenberg *et al.* (1998) entwickelte Methode zur Kultivierung der ES-Zellen aus der inneren Zellmasse (~100 - 200 Zellen) von E3.5 Tage alten murinen männlichen Blastozysten verwendet, welche als pluripotent charakterisiert wurde (Evans und Kaufmann, 1981). Die beschriebene Pluripotenz des EBs kann mit Hilfe des *leukämieinhibierenden Faktors* (LIF) in der *in vitro*-Kultur für unbegrenzte Zeit aufrechterhalten

werden (Smith *et al.*, 1988). Während der EB-Kultivierung werden erst aus endodermartigen Zellen eine äußere Hülle, danach eine ektodermale Randzone sowie mesodermale Zellen gebildet (Wobus und Boheler, 2005). Im weiteren Verlauf der Kultivierung differenzieren sich ES-Zellen im EB spontan zu spezialisierten Gewebetypen, welche für diese Arbeit relevant waren, wie die glatten Muskelzellen (Rohwedel *et al.*, 1994), die Endothelzellen (Risau *et al.*, 1988) und die Kardiomyozyten (Doetschman *et al.*, 1985). Dabei zeigte sich in der *in vitro*-Kultur eine temporäre Übereinstimmung der Gewebespezifität, einhergehend mit den dazugehörigen Genexpressionen und Proteinniveaus, wie sie auch *in vivo* beobachtet wurden (Leahy *et al.*, 1999). Darauf aufbauend, etablierten sich verschiedene genetische Endpunkt- und Differenzierungsmarker für die embryonale Entwicklung, die wir im Rahmen dieser Arbeit im EB untersuchten, wie z. B. *nkx2.5* für die frühe embryonale Entwicklung (Adler *et al.*, 2007).

1.5 Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR)-Familie

Die Familie der "*peroxisome proliferator activated receptors*" (PPARs) (Abb. 1-3) gehört zu den durch ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren, die als Kernrezeptoren bzw. Kernhormonrezeptoren wirken (Lazar, 2005). Die ersten PPAR-cDNA-Klone wurden bei der Suche nach den Aktivatoren der Peroxisomenproliferation aus der Nagetierleber isoliert (Isseman und Green, 1990). Die PPARs erhöhen maßgeblich die Enzymaktivität der β -Oxidation (Lock *et al.*, 1989) und dienen damit der Energiegewinnung durch den Abbau von Fettsäuren (FS) zu Acetyl-CoA, welches dann im Citratsäurezyklus verstoffwechselt wird. Frühere Untersuchungen der PPARs im Mausmodell (Gronemeyer und Moras, 1995) zeigten, dass diese Kernrezeptoren nicht nur in den Fett-/Zuckerstoffwechsel involviert sind, sondern auch einen Einfluss auf die Angiogenese haben (Desvergne und Wahli, 1999). In den vergangenen Jahren erfolgten deswegen weitere Analysen hinsichtlich der Funktion und Struktur dieser Kernrezeptoren (Gampe *et al.*, 2000).

1.5.1 Struktur und Wirkungsweise der PPARs

Strukturell besteht das Grundgerüst dieser orphanen Kernrezeptoren aus einer N-terminalen A/B-Domäne, einer DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer C-terminalen F-Domäne (Desvergne und Wahli, 1999) (Abb. 1-2). Die am N-Terminus-befindliche A/B-Domäne weist zwischen den einzelnen Kernrezeptoren variable Größen auf und hat eine ligandenunabhängige Transkriptionsaktivierungsfunktion1 (AF1) mit einer "*mitogen activated protein kinase*" (MAPK)-Phosphorylierungsstelle (Adams *et al.*, 1997).

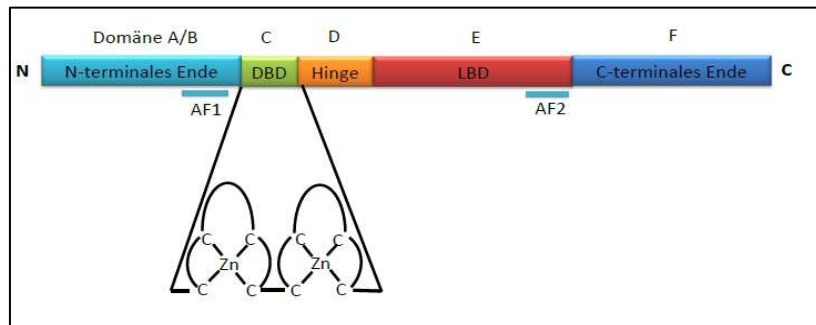


Abb. 1-2: Struktur der Kernhormonrezeptoren

Struktureller Aufbau von Kernhormonrezeptoren, bestehend aus einem N- und C-terminalen Ende, einer DNA-bindenden Domäne (DBD), einer Hinge-Domäne und einer ligandenbindenden Domäne (LBD). Die DBD trägt zwei Zinkfingerdomänen. Das N-terminale Ende trägt die AF1-Domäne, die AF2-Domäne ist auf der LBD lokalisiert (modifiziert nach Alberts, 2002).

Durch die Phosphorylierung von Ser112 wird die Fähigkeit zur Bindung von Liganden und damit auch die Transkriptionsaktivität der PPARs herabgesetzt (Shao *et al.*, 1998). Des Weiteren existiert eine SUMOylierungsstelle (K107) (*"small ubiquitin-related modifier"*), welche aufgrund einer posttranslationalen Modifikation von PPAR- γ -Proteinen entstanden ist und sowohl mit einer Inhibierung als auch mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors einhergehen kann (Yamashita *et al.*, 2004).

Die DBD beinhaltet für eine spezifische DNA-Bindung und -Erkennung zwei Zinkfinger-Domänen (Gronemeyer und Laudet, 1995), welche aus 66 - 70 Aminosäuren (AS) aufgebaut sind (Freedman, 1992). Die Hinge-Domäne ermöglicht eine freie Rotation zwischen der DBD und der ligandenbindenden Domäne (LBD), welche eine Größe von 250 AS hat (Wurtz *et al.*, 1996). Die LBD hat eine typische T-Form und wird von fünf Helices (3, 5, 7, 11 und 12) umgeben (Willson *et al.*, 2000). Die Transkriptionsaktivität und die Ligandenbindung an die LBD werden durch die Helix 12-tragende konstitutive Aktivierungsfunktion2-Domäne (AF2-Domäne) und die Signaturmotive reguliert (Burmester *et al.*, 1988). Die Funktion, der C-terminalen F-Domäne der PPARs ist bislang nur unzureichend erklärbar, wird aber derzeit wissenschaftlich erforscht (Desvergne und Wahli, 1999).

Basierend auf dem Wissen zum strukturellen Aufbau (Abb. 1-2), soll nun der Aktivierungsmechanismus von PPAR- γ beleuchtet werden. Nach der Bindung von Liganden der am hydrophoben C-terminalen Ende liegenden LBD über elektrostatische Wechselwirkungen erfolgt eine Konformationsänderung zum einen in der LBD, wobei der Ligand umschlossen wird, und zum anderen in der AF2-Domäne (Abb. 1-2, Abb. 1-3). Viele Agonisten der PPARs bewirken eine aktivierende Konformationsänderung an der LBD (Abb. 1-3), wodurch eine

stabile Bindung des Rezeptors an die DNA induziert wird. Zudem erfolgt eine Veränderung der Rezeptoroberfläche, welche es Kofaktoren und basalen Proteinen des Transkriptionskomplexes ermöglicht, sich an den Rezeptor zu binden und die Transkription spezifischer Gene zu initiieren (Evans 1988; Wurtz *et al.*, 1996).

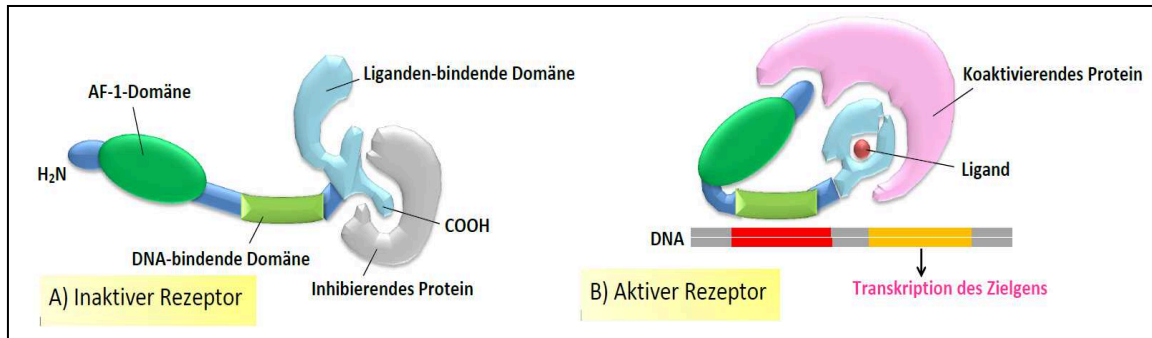


Abb. 1-3: Kernrezeptor-Superfamilie

(A) Inaktiver Rezeptor: bindet ein Inhibitor die ligandenbindende Domäne (LBD), wird die Transkription der Zielgene nicht induziert. (B) Aktiver Rezeptor: heftet sich ein koaktivierendes Protein an die LBD verdrängt es den inhibitorischen Liganden und legt somit die DNA-bindende Domäne (DBD) an der DNA frei. Dadurch wird die Transkription von spezifischen Genen induziert. (modifiziert nach Alberts *et al.*, 2002).

Durch die Aktivierung der AF2 werden Helix 12 konsolidiert und die Kofaktoren rekrutiert. Dies führt zu einer stabilen Bindung des Rezeptors an das "hormon response element" (HRE) am 5'-Ende der DNA in der Nähe der transkriptionellen Initiationsstelle (Xu *et al.*, 1999). Die Antagonisten hingegen verursachen eine Zerstörung der LBD-Struktur bzw. verändern die Helix 12 so, dass sich keine Koregulatoren binden können (Desvergne und Wahli, 1999). Die PPARs binden an das HRE als Heterodimer in einem Komplex mit "retinoid X receptor" (RXR)/"retinoic acid receptor" (RAR) und wirken als Transkriptionsfaktor (Watanabe *et al.*, 2003). Der "retinoid X receptor" (RXR-Rezeptor), bindet den 9-cis Retinoidsäure-Rezeptor und bildet mit dem ligandenaktivierten PPAR- γ einen Heterodimerkomplex, welcher eine Bindung an das "peroxisome proliferator response element" (PPRE) der DNA ermöglicht. Das PPRE besteht bei allen drei PPAR-Subtypen aus einer direkten Wiederholung der Basenabfolge AGGTCA (Watanabe *et al.*, 2003). Die Heterodimerisierung ermöglicht es, über nur wenige Rezeptoren eine große Anzahl verschiedener funktioneller Rezeptorkomplexe zu bilden und führt damit zur Aktivierung verschiedener Signalwege. Die Stabilisierung und DNA-Bindung des Rezeptorkomplexes trägt dazu bei, die Signalübertragung von Kernrezeptoren sowie die Transkription der spezifischen Gene zu regulieren. Mittels bestimmter Koaktivatoren und Kointegratoren ist es möglich, die Transkriptionseffizienz von Zielgenen zu beeinflussen (Rowan *et al.*, 2000).

1.5.2 Funktion und Vorkommen der PPARs

Die PPARs liegen im Zytoplasma bzw. im Zellkern vor und wurden als thyroidhormonähnliche Rezeptoren beschrieben, welche über Ligandenbindung bestimmte Transkriptionsfaktoren aktivieren (Berger und Moller, 2002). In den neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden drei PPAR-Subtypen isoliert (Dreyer *et al.*, 1992): PPAR- α (Green 1995), PPAR- β/δ (Yoshikawa *et al.*, 1996) und PPAR- γ (Greene *et al.*, 1995), welche auch in verschiedenen Mammalia nachgewiesen werden (Abb. 1-4) (Zhu *et al.*, 1993).

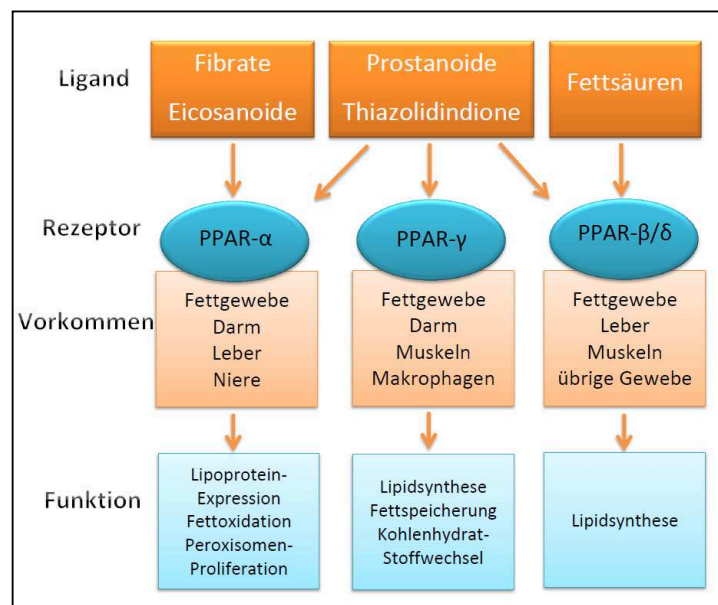


Abb. 1-4: PPAR-Familie: Liganden, Rezeptoren, Gewebespezifität und Wirkung

Die Subtypen der PPARs zeichnen sich durch ein spezifisches Gewebesvorkommen und eine spezifische Ligandengruppe aus (modifiziert nach Matthaei *et al.*, 2001).

Wie bereits erwähnt, spielen die PPARs eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels und beeinflussen diverse zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Braissant und Wahli, 1998). Die Konzentration der PPAR-mRNA schwankt in den einzelnen Gewebetypen, wobei PPAR- β/δ im Allgemeinen in höheren Mengen vorhanden sind als die anderen PPARs (Desvergne und Wahli, 1999). Da die PPARs an der Regulation der β -Oxidation beteiligt sind, sorgen sie während der Differenzierung von Endothel, glatter Muskulatur und kardialen Strukturen für die Bereitstellung der benötigten Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) (Sharifpanah *et al.*, 2008). Es konnte nachgewiesen werden, dass Liganden der PPAR- α und - γ eine proentzündliche Wirkung auf die Blutgefäße haben und den Endothelin-1-Signalweg unterdrücken (Montezano *et al.*, 2007). Andererseits wurde auch eine enge Beziehung zwischen dem Herz-Kreislauf-System und PPAR- α beschrieben.

1.5.2.1 PPAR- α

Der PPAR- α spielt eine wichtige Rolle bei der Lipoproteinsynthese, der Peroxisomenproliferation und der Fettoxidation, denn die PPAR- α -Expression ist bei erhöhter β -Oxidation während des Fettstoffwechsels in der Leber, dem Herz, der Nieren und in der Muskulatur hochreguliert (Matthaei *et al.*, 2001). So konnten Goikoetxea *et al.* (2006) eine Reduktion der PPAR- α -Proteinkonzentration bei Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung nachweisen. Diese Reduktion von PPAR- α führte zu einer chronischen Verringerung der Fettsäureoxidation und damit zu einer kardialen Lipotoxizität sowie Apoptose. Außerdem bewirkte der Verlust von PPAR- α während der kardialen Hypertrophie eine Verringerung der kardialen Funktionen und der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese (Braissant und Wahli, 1998). Im Rahmen der Kardiomyogenese konnte eine Beteiligung von aktiviertem PPAR- α im Stammzellmodell durch Sharifpanah *et al.* (2008) demonstriert werden. Diese Studie deutet darauf hin, dass PPAR- α eine Vitalitätsverbesserung und eine deutliche Differenzierung der Herzmuskelzellen bewirkt. Zudem wirkt PPAR- α auf die Endothelzelldifferenzierung (Meissner *et al.*, 2004) und die Entwicklung der glatten Muskulatur (Lien *et al.*, 2013).

1.5.2.2 PPAR- β/δ

Wie auch die anderen PPARs ist der PPAR- β in den Energie- und Fettstoffwechsel involviert (Yoshikawa *et al.*, 1996). Erstmals wurde das PPAR- β -Protein des *Xenopus spec.* sequenziert (Dreyer *et al.*, 1992), aber durch seine geringe Homologie zu den PPAR- β der Mammalia wurde es schlussendlich als PPAR- β/δ bezeichnet, wobei PPAR- δ repräsentativ für die murine Proteinsequenz steht (Kliwer *et al.*, 1994). Parallel zu allen PPAR-Isoformen beeinflusst PPAR- β/δ auch das kardiovaskuläre System. Darum konnte Piqueras *et al.* (2007) zeigen, dass durch die Aktivierung der PPAR- β/δ in HUVEC-Zellen die Proliferation von Endothel bzw. die Angiogenese durch VEGF-abhängige Mechanismen induziert wird. Nach Aktivierung des PPAR- β/δ durch dessen Agonisten konnten Zarzuelo *et al.* (2013) im Ratten-Modell eine Senkung der kardialen Hypertrophie zeigen sowie eine antientzündliche Wirkung in Blutgefäßen (Lee *et al.*, 2003). Weiterhin wurde dokumentiert, dass die Aktivierung von PPAR- β/δ eine Senkung des endothelialen ROS-Signals verursacht (Zarzuelo *et al.*, 2013). Zusammenfassend konstatiert, dass PPAR- β/δ die Endothelhomoestase und damit den Blutdruck entscheidend beeinflusst.

1.5.2.3 PPAR- γ

Die PPAR- γ wurden im Herzen (Asakawa *et al.*, 2002), im Endothel, in der Leber, in der glatten Muskulatur, in der Skelettmuskulatur und in anderen Geweben nachgewiesen (Bishop-Bailey, 2000). Drei verschiedene Proteinisoformen sind im murinen bzw. humanen System bekannt: PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 und PPAR- γ 3 (Fajas *et al.*, 1998). PPAR- γ 1 wird vorzugsweise in den Endothelzellen, der glatten Muskulatur (VSMC) und in Immunzellen, wie den Monozyten und den Makrophagen, exprimiert (Law *et al.*, 2000). PPAR- γ 2 unterscheidet sich von PPAR- γ 1 durch 30 zusätzliche AS am N-terminalen Ende (Tontonoz *et al.*, 1994). Der humane PPAR- γ ist 479 AS lang (Beamer *et al.*, 1997) und erfüllt eine wichtige regulatorische Funktion im Glukosemetabolismus, der Lipidsynthese, der Fettspeicherung sowie während der Adipozyten- und der Makrophagendifferenzierung (Desvergne *et al.*, 2006). Alle Isoformen sind u. a. im Fettgewebe lokalisiert und tragen zur Entwicklung von Adipozyten aus Fibroblasten bei (Tontonoz *et al.*, 1994). Veränderungen der PPAR- γ -Synthese können zu Tumorerkrankungen (Panigraphy *et al.*, 2005), Diabetes mellitus Typ II (Yen *et al.*, 1997) oder zu Arthropathie (Jiang *et al.*, 1998) führen. Bei humanen Lungentumoren spricht eine geringe PPAR- γ -Menge für eine schlechte Prognose des Patienten (Sasaki *et al.*, 2002). Weiterhin ist PPAR- γ während der Organogenese, Schwangerschaft und Entwicklung des Fötus bedeutend (Tarrade *et al.*, 2001). In weiteren Studien zeigte PPAR- γ eine antiinflammatorische (van Knethen und Brüne, 2003) und proapoptotische Wirkung (Bodles *et al.*, 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass PPAR- γ an der Entwicklung von kardialen Geweben beteiligt ist (Barak *et al.*, 1999). Dabei wirkt PPAR- γ in gleicher Weise wie PPAR- α (s. Kapitel 1.5.2.1, Abb. 1-3). Zudem zeigte die Aktivierung bei Diabetes mellitus Typ II-Patienten eine Reduktion des Bluthochdruckes, was mit der Senkung des Insulinlevels im Blut durch TZD einherging (Ogihara *et al.*, 1995). Dabei erfolgte zugleich eine verminderte Gefäßneubildung in HUVECs (Jozkowicz *et al.*, 2002). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Wirkung von PPAR- γ auf das Herz-Kreislauf-System noch nicht in ausreichendem Maß verstanden ist. Die vorliegende Arbeit spürt der kardiovaskulären Differenzierung aus diesen Grund nach und erhellt physiologische Zusammenhänge.

1.5.3 Natürliche Liganden der PPARs

Zu den natürlichen Liganden der PPARs gehören sowohl gesättigte als auch ungesättigte FS (Linolsäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure), Eicosanoide und Prostanoiden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass gesättigte FS schwächer mit den PPARs interagieren als ungesättigte. Der in dieser Arbeit untersuchte PPAR- γ wird v. a. durch polyungesättigte

FS und Eicosanoide, z. B. 15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ aktiviert. Dabei wird deutlich, dass PPAR- γ eine höhere Bindungsaktivität für mehrfach ungesättigte FS besitzt. PPAR- α hingegen hat eine geringere Affinität zu diesen natürlichen Liganden und bindet vorzugsweise an die Stearin- und die Palmitinsäuren. Die erwähnten natürlichen Liganden der PPARs werden auf drei verschiedenen Wegen synthetisiert. Zum einen kann ein aktiver Ligand in einem endokrinen Organ synthetisiert werden und in die Zielzelle eintreten. Andererseits können Liganden in der Zelle aus Prohormonen selbst hergestellt werden. Eine dritte Möglichkeit ist die Synthese eines Stoffwechselproduktes innerhalb der Zielzelle, was v. a. bei Steroidrezeptoren auftritt (Dreyer *et al.*, 1992). Diese Rezeptoren bilden ein komplexes Proteinheterodimer, welches diverse Chaperone wie "heat shock protein" 90 (Hsp90) oder Hsp59 enthält. Durch die Interaktion mit dem Liganden kommt es zur Dissoziation des Komplexes und zur nukleären Translokation, wo die Bindung des Dimers an die HRE-Region die Transkription des Zielgens initiiert (Aranda und Pascual, 2001). Eine weitere Möglichkeit, die Hormonrezeptoren zu aktivieren, sind ligandenunabhängige Wege wie die Phosphorylierung von spezifischen Rezeptordomänen der NH₂- und COOH-terminalen Region von AF1 und AF2 (Power *et al.*, 1991), Wachstumsfaktoren ("insulin-related growth factors" (IGF)/Somatomedin) (Desouza *et al.*, 2009) oder Signaltransduktionsproteinen (Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)) (White und Kahn, 1994; Aranda und Pascual, 2001).

1.5.4 Synthetische Liganden von PPAR- γ

Neben den natürlichen Liganden existieren für die PPARs auch synthetische Liganden, die entweder nur einen spezifischen Rezeptor beeinflussen oder von allen drei Subtypen gebunden werden können (Issemann und Green, 1990). Dieses ist dadurch begründet, dass die Sequenzen der LBD- und DBD-Region (siehe Kapitel 1.5.1) bei den Subtypen zu 60-70 % homolog sind (Desvergne und Wahli, 1999). Ebenso können "non-steroidal anti-inflammatory drugs" (NSADs) an PPAR- α sowie an - γ binden, aufgrund ihrer antientzündlich und schmerzlindernden Wirkung können sie auch als Antirheumatikum (z. B. Ibuprofen) eingesetzt werden (Lehmann, 1995).

1.5.4.1 Agonisten der PPAR- γ und ihre Wirkung

Die natürlichen bzw. synthetischen Agonisten der PPAR- γ führen zur Aktivierung des Rezeptors und somit zur Regulation von kardialer Hypertrophie (Liang *et al.*, 2003), Inflammation (Rizzo und Fiorucci, 2006) und vaskulären Funktionen (Chinetti *et al.*, 2001).

Das in dieser Arbeit verwendete Ciglitazon (CGZ) ist ein synthetisches Thiazolidindion (TZD) und wurde 1978 (Takeda Chemicals Ltd., Osaka, Japan) entwickelt. Obwohl dessen blutdrucksenkende Wirkung am Tiermodell beschrieben wurde, erlangte CGZ nie den Status als Therapeutikum (Chang *et al.*, 1983), stattdessen wurden seine Analoga, wie Pioglitazon (Actos[®]) (Takeda), Troglitazon (Rezulin[®]) (Daiichi Sankyo Co.) und Rosiglitazon (Avandia[®]) (GlaxoSmithKline) als „Insulinrezeptor-Sensitizer“ für die Diabetes mellitus Typ II-Therapie eingesetzt (Spiegelman, 1998). Im Laufe der klinischen Anwendungen von Rosiglitazon wurden gehäuft kardiovaskuläre Störungen beschrieben, die schließlich ein Verbot von Rosiglitazon-haltigen Medikamenten am 1. November 2010 nach sich zogen (Arzneimittelüberwachungsbehörde BfArM, 2010). Die TZD werden als Racemate eingesetzt, wobei nur das S-Enantiomer in der klinischen Therapie zum Einsatz kommt. Sie sind aus einer Acetatgruppe mit einem zentralen Ring und einer großen lipophilen Substruktur aufgebaut (Abb. 1-5) (Willson *et al.*, 2000).

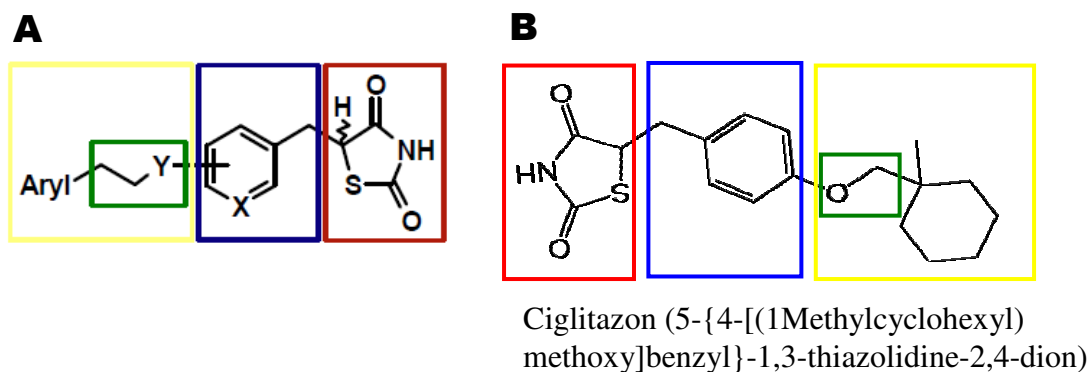


Abb. 1-5: Chemische Struktur der Glitazone

(A) Die chemische Grundstruktur der Glitazone ist gekennzeichnet durch eine Thiazolidindion-Kopfgruppe (rot), einen lipophilen Rest (gelb) und einen zentralen Aryl-Spacer (blau) sowie einen Linker (grün). (B) Ciglitazon (modifiziert nach Willson *et al.*, 2000, Syha, 2005).

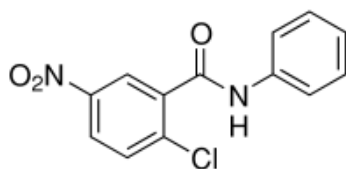
Diese hoch lipophilen TZDs (Giaginis *et al.*, 2007) gelangen durch Diffusion in das Zytoplasma (Hajri und Abumrad, 2002), wo sie mit PPAR- γ interagieren. Anschließend diffundiert der ligandenaktivierte Rezeptor durch die Kernmembran und bildet, wie eingangs erläutert, einen Heterodimerkomplex mit dem RXR-Rezeptor, wodurch die Bindung des PPARE an die DNA ermöglicht wird (Watanabe *et al.*, 2003). Dadurch wirkt der Rezeptorkomplex aus PPAR und RXR als Transkriptionsfaktor, welcher die Synthese von Glukosetransportproteinen induziert

und damit die zelluläre Glucoseaufnahme fördert. So kann CGZ durch die Bindung an den PPAR- γ die insulinvermittelten Stoffwechselwege aktivieren (Mukherjee *et al.*, 1997). Des Weiteren führt die Dimerisierung von PPAR und RXR zur Aktivierung der Adipozyten-Differenzierung (Balfour und Plosker, 1999), wodurch das subkutane inaktive Fettgewebe zunimmt und der aktive viszerale Fettanteil gesenkt wird (Miyazaki *et al.*, 2002). Durch den Einfluss der Glitazone auf die Apoptose, die Proliferation, den Energie- und den Fettstoffwechsel, die Entzündungshemmung sowie den Gefäßschutz wurden sie zu potentiellen Therapeutika auch gegen Artherosklerose diskutiert (Han und Roman, 2007). Dieses wird durch verschiedene *in vitro*-Studien begründet, wo z. B. die Proliferation (Xin *et al.*, 1999) und die Migration (Goetze *et al.*, 2002) von HUVECs durch CGZ gesenkt werden konnten. Goetze *et al.* (2002) untersuchten diese antiangiogenen Mechanismen der TZD auf die Endothelzellen, welche auf die Unterdrückung der "serine-threonine protein kinase", des VEGF-Rezeptor-1 (Flt1) sowie des VEGF-Rezeptor-2 (Flk1/KDR) und auf die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts zurückzuführen waren (Xin *et al.*, 1999). Zudem sind die PPAR- γ -Agonisten vaskuloprotektiv und verhindern durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Jiang *et al.*, 1998) die Entstehung von Gefäßentzündungen (Murata *et al.*, 2001). Des Weiteren führte eine PPAR- γ -Aktivierung durch TZDs zur Apoptose und Unterdrückung von Makrophagen (Chinetti *et al.*, 1998) und T-Lymphozyten (Harris und Phipps, 2001). Nichtsdestotrotz existiert derzeit keine eindeutige Erklärung für die klinischen Nebenwirkungen, die zum Verbot dieser Substanzen führten. Daher untersucht die vorliegende Arbeit nun im Speziellen die Wirkung von CGZ auf die Differenzierung von Endothel- und Herzmuskelzellen.

1.5.4.2 Antagonist der PPAR- γ

In dieser Arbeit wurde weiterhin 2-Chloro-5-Nitro-N-Phenylbenzamid (GW9662) als selektiver, irreversibler PPAR- γ -Antagonist (Abb. 1-6) untersucht. Die Struktur von GW9662 bietet die Möglichkeit einer kovalenten Bindung mit den nukleophilen Aminosäureketten der PPAR-LBD (siehe Kapitel 1.5.1), worauf seine spezifische Inhibition der regulären Ligandenbindung beruht (Leesnitzer *et al.*, 2002). Interessanterweise konnten diverse Studien nicht nur Effekte von GW9662 auf PPAR- γ , sondern auch agonistische Eigenschaften auf PPAR- α nachweisen (Leesnitzer *et al.*, 2002, Seimandi *et al.*, 2005, Sharifpanah *et al.*, 2008). Eine genauere Untersuchung der Spezifität von GW9662 zeigte eine 10 - 600-fach höhere Bindung an PPAR- γ als an PPAR- α und - β/δ , was durch Szintillationsproximitätstests an humanen PPARs ermittelt wurde. Deshalb ist GW9662 ein optimales Werkzeug, um spezifische PPAR- γ -vermittelte biologische Funktionen in kultivierten Zellen zu untersuchen, ohne dass seine Wirkung in der

Zellkultur verloren geht (Leesnitzer *et al.*, 2002). Parallel zu den multiplen Wirkungsweisen von PPAR- γ in verschiedenen Gewebetypen, konnten auch sehr unterschiedliche Effekte von GW9662 verdeutlicht werden. Zum Beispiel inhibierte der untersuchte PPAR- γ -Antagonist erwartungsgemäß die Adipozytendifferenzierung, andererseits beeinflusste er die Osteoklasten-Aktivität (Leesnitzer *et al.*, 2002). Des Weiteren hatten von Seargent *et al.* (2004) gezeigt, dass GW9662 die Vitalität und das Wachstum humaner Brustkrebszellen reduziert. Zudem unterscheiden sich die jeweiligen zellulären Mechanismen, denn in Ovarien chinesischer Hamstern wurde die Aktivität des "epithelial Na^+ channel" (ENaC) durch GW9662 gehemmt, wohingegen in "mouse cortical collecting duct cell line" (mpkCCDC14 cell) vor allem der Insulintransport [über den Na^+ -Kanal] reduziert wurde (Pavlov *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit sollen daher auch die bisher wenig verstandenen Effekte von GW9662 auf mES-Zellen und die Kardiomyogenese untersucht werden (Sharifpanah *et al.*, 2008).



GW9662 (2-Chloro-5-Nitro-N-Phenylbenzamid/ Lopac-M-6191)

Abb. 1-6: Synthetischer Antagonist/ Inhibitor für PPAR- γ

2 Zielstellung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache (Mendis *et al.*, 2011), wobei v. a. die Veränderung und der Verlust der Funktionsfähigkeit des Herzens bzw. der Blutgefäße im Zentrum ärztlichen Bemühens stehen. In der Aktivierung der "*peroxisome proliferator activated receptors*" (PPARs) liegt ein möglicher Therapieansatz für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Marx, 2001). So wurden beispielsweise PPAR- γ -Liganden, vor allem Glitazone zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ II eingesetzt, aber 2010 aufgrund ihrer Induktion von kardialen Fehlfunktionen sowie leberschädigenden Nebenwirkungen vom Markt genommen. Dennoch sind diese Substanzen essentiell für die Grundlagenforschung zur Untersuchung der Wirkmechanismen der PPARs, da die Thiazolidindione (TZD) als potente Agonisten der PPARs die Angiogenese, Kardiogenese sowie Vaskulogenese beeinflussen. Um neue und bessere therapeutische Ansätze zu finden, müssen die molekularbiologischen Mechanismen der PPARs, deren Liganden sowie deren Wirkung auf den Organismus erforscht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die murinen embryonalen Stammzellen der Zelllinie CGR8 als *in vitro*-Modell eingesetzt. Hierbei bot sich die Möglichkeit, die embryonale Entwicklung sowie die Entstehung spezifischer Gewebe und Krankheiten *in vitro* zu untersuchen. Ebenso konnten das Differenzierungs- und das Proliferationsverhalten von Gewebetypen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) untersucht werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch die Zugabe von TZD wie CGZ das Differenzierungsverhalten der mesodermalen Strukturen, vor allem von kardialen Zellen, glatter Muskulatur und dem Endothel, zu untersuchen.

Es wurden dabei folgende Fragestellungen erörtert, die im Kapitel 4 beantwortet werden:

- 1.) In welchem Zeitfenster differenzieren sich mesodermale Strukturen wie Endothel, glatte Muskulatur im *in vitro*-EB-Modell?
- 2.) Werden die PPARs im *in vitro* exprimiert?
- 3.) Welche Konzentration der verwendeten Substanzen wirken nicht zytotoxisch auf die ES-Zellen und können somit für die experimentellen Arbeiten weitergenutzt werden?

- 4.) Welchen Einfluss haben PPAR- γ -Agonisten auf endotheliale Strukturen, glatte Muskulatur und kardiale Entwicklung?
- 5.) Welchen Effekt haben PPAR- γ -Antagonisten auf die endothelialen Strukturen, die glatte Muskulatur und die kardiale Entwicklung?
- 6.) Wird die ROS- und NO-Bildung durch die Behandlung von mES-Zellen mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten beeinflusst?

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind die mES-Zelllinien CGR8 und E14Tg2a.4, letztere benötigt murine Fibroblasten als *Feeder*-Zellen.

Bei der CGR8-Zelllinie handelt es sich um eine embryonale Stammzelllinie aus der Spezies *Mus musculus* (Stamm129) mit dem Karyotyp 40 XY. Diese Zelllinie wurde von der Firma *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) über Sigma Aldrich erworben. Sie ist eine keimblattkompetente Zelllinie aus der inneren Zellmasse von 3,5 Tage alten männlichen präimplantierten Mausembryonen (Nichols *et al.*, 1990). Die Zellen können durch Zugabe des *leukämieinhibierenden Faktors* (LIF) im undifferenzierten Stammzellzustand gehalten werden (Smith *et al.*, 1988).

Bei der E14Tg2a.4-Zelllinie handelt es sich um den Wildtyp der mES-Zelllinie, welche sich von den 129P2/OlaHsd Mäusen ableitet. Die GFP-Flk1⁺-markierten E14Tg2a.4 (E14Tg2a.4-GFP) wurden mittels stabiler Elektroporation im Labor von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. Thomas Braun (Bad Nauheim/MPI) mit dem pflk-Vektor transfiziert. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. Thomas Brauns Arbeitsgruppe erwarb diese Zelllinie von der *American Type Culture Collection* (ATCC). Prof. Dr. rer. nat. Heinrich Sauer (Giessen/Justus-Liebig-Universität) stellte die Zelllinie im Rahmen eines Kooperationsprojektes zur Verfügung. Sie wurde 1987 von Hooper entwickelt, um die frühe murine Embryogenese nachempfinden zu können (Hooper *et al.*, 1987). Der verwendete Vektor für pflk enthält einen endothelspezifischen Promotor, welcher eine bicistronische Kasse kontrolliert. Weiterhin besteht er aus einem Neomycin-Resistenzgen, einer IRES (*"internal ribosome entry site"*)-Sequenz (Jang und Wimmer, 1990) und einem Reportergen (EGFP). Außerdem enthält der Vektor eine flk-Enhancer-Sequenz, welche die Spezifität des Promotors unterstützt (Kappel *et al.*, 1999).

Murine Fibroblasten wurden als *Feeder*-Zellen (C57BL, Passage 4) zur Kultivierung der E14TG2.a (3.2.1) benötigt. Die Fibroblasten wurden vorher in der Transfusionsmedizin des UKJ Jena mit ionisierender Strahlung (2 x 15 Gy) inaktiviert. Für die Kultivierung der

E14Tg2a.4-Zellen sind inaktivierte Fibroblasten wichtig, da diese wichtige Stoffe wie LIF und Wachstumsfaktoren sezernieren.

3.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Während der Untersuchungen wurden dem Kultivierungsmedium (bis auf die im Serum befindlichen) keine weiteren Wachstumsfaktoren zugesetzt.

3.2.1 Einfrieren, Auftauen und Passagieren

Die in T25-Flaschen mit LIF-Mediumkultivierten Zellen wurden durch 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA von der Gelatineschicht abgelöst. Anschließend wurde die Dissoziationsreaktion mit 2 ml Komplettmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in 15 ml-Reaktionsgefäße mit 10 ml Komplettmedium überführt und bei 800 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium pro Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden eine Woche bei -80°C, anschließend bis zum weiteren Gebrauch bei -150°C (SANYO, Ultra Low) gelagert.

Die gefrorenen Zellen wurden in 1 ml angewärmtem Komplettmedium resuspendiert. Die aufgetauten Zellen wurden in vorbereitete Reaktionsgefäße mit 10 ml Komplettmedium überführt und bei Raumtemperatur (RT) mit 800 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml LIF-Medium aufgenommen, die Zellsuspension in 0,1 % gelatinebeschichtete Kulturflaschen (Monolayer) pipettiert und 4 ml LIF-Medium hinzugegeben. Zur Kultivierung gehörte der tägliche Wechsel von 5 ml LIF-Medium. Die Zellen wurden aus den 0,1 % gelatinebeschichteten Kulturflaschen in die Spinnerflasche (SF) überführt, sobald sie zu 75 % konfluent waren.

Die benötigten Medien wurden im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA angelöst. Nach erneuter Zugabe von 1 ml 0,25% Trypsin/EDTA lösten sich die Zellen von der Gelatineschicht ab. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 2 ml Komplettmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und in eine neue, mit 0,1 % gelatinebeschichtete Kulturflasche mit 5 ml LIF-Medium überführt.

3.2.2 Spinnerflaschenkultur

Nach enzymatischer Vereinzelung der undifferenzierten Stammzellen mit 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA wurden die Zellen in 15 ml-Reaktionsgefäße mit 10 ml Komplettmedium aufgenommen. Die Zellsuspension mit $1 \cdot 10^7$ Zellen wurde in eine SF mit 125 ml Komplettmedium überführt. Die mES-Zellen in der SF wurden auf einer Rühreinheit des CELLSPIN Systems bei 22,5 rpm und einem Drehrichtungswechsel von 1440° kultiviert. Der Tag, an dem die SF angesetzt wurde, wurde als Tag 0 festgelegt. Die leicht geöffneten Seitendeckel ermöglichten einen konstanten Gasaustausch. Nach 24 h wurden 125 ml Komplettmedium hinzugegeben. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit Entnahme von 125 ml Medium und Auffüllung mit frischem Komplettmedium.

3.3 Inkubation der *embryoid bodies* mit PPAR- γ -Liganden

Am Tag 4 der SF-Kultur wurden 20 EBs auf adhärente Petrischalen (PS) \varnothing 40 x 11 mm ausplattiert. Je nach zu untersuchenden Proteinen und Genen wurde der Inkubationszeitraum mit den PPAR- γ -Liganden entsprechend der bekannten Expressionszeiträume angepasst (Abb. 3-1). Um die Effekte der PPAR- γ -Liganden untersuchen zu können wurden 20 CGR-/E14-EBs auf adhärente PS am Tag 4 ausplattiert und in DMSO-gelösten Substanzen in Komplettmedium inkubiert (Tab. 1). Zusätzliche Inkubationen für Teilversuche wurden mit 10 μ M MK886, einem PPAR- α -Antagonist und den Radikalfängern 100 μ M Trolox (Vitamin-E Derivat) sowie 100 μ M N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin (NMPG) vorgenommen.

Tab. 1: Verteilung der Konzentrationen der PPAR- γ -Aktivatoren und /-Inhibitoren

Tag der Probenfixierung	Tag 6 (4+2)	Tag 12 (4+8)			Tag 14 (4+10)			Tag 16 (4+12)			Tag 18 (4+14)		
Ciglitazon (μ M)	10	1	10	50	1	10	50	1	10	50	1	10	50
GW9662 (μ M)	10	1	2	10	1	2	10	1	2	10	1	2	10

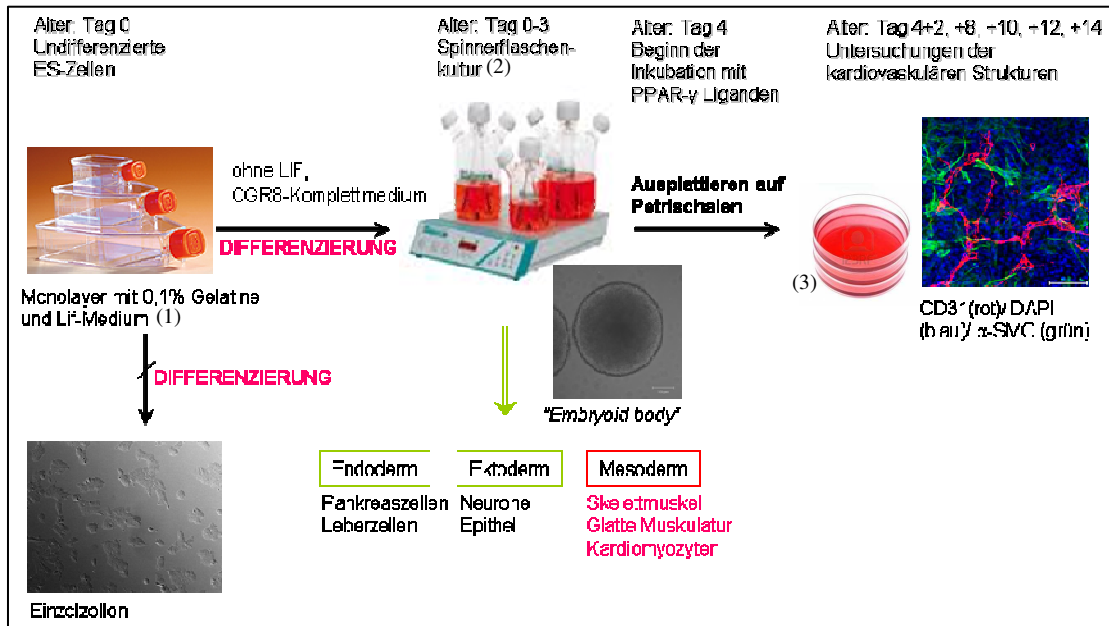


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der mES-Zellkultur

Die undifferenzierten mES-Zellen wurden mittels LIF kultiviert, um die Differenzierung zu hemmen. Die Zellsuspension wurde in das Spinnerflaschen-System überführt und ohne LIF kultiviert. Die Differenzierung zu allen drei Keimblättern setzte ein. Am Tag 4 der Spinnerflaschen-Kultur wurden die "embryoid bodies" auf Petrischalen ausgesät und inkubiert (modifiziert ^{1, 2, 3}).

3.4 Messung der Kontraktionen

Um die Frequenz der Kontraktionen der im EB differenzierten Kardiomyozyten und die Anzahl kontrahierender EBs zu ermitteln, wurden ca. 15 vier Tage alte EBs auf adhärenenten PS kultiviert. Zu den oben genannten Zeitpunkten (Tab. 2) wurde die Anzahl kontrahierender EBs pro PS/Inkubation ermittelt. Die Frequenz der Kontraktionen wurde aus den Kontraktionen/15s berechnet, welche auf eine Minute*4 hochgerechnet wurden. Daraus ergab sich die Kontraktionsfrequenz/min (bpm).

3.5 Scratch-Migrations-Assay

Die EBs wurden mit 0,25 % Trypsin/EDTA vereinzelt und die Dissoziationsreaktion mit 5 ml CGR8-Komplettmedium gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension bei 800 x g für 4 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 3 ml Medium aufgenommen. Es wurden 20.000 Zellen/9,2 cm² in 0,1 % gelatinebeschichtete 6-Lochplatten überführt. Am Tag 7 wurden die adhärenenten Einzelzellen, welche 80 %

konfluent waren, mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten sowie deren Kombination inkubiert. Gleichzeitig wurde mittels normierter Pipettenspitze ein definierter Bereich von der Einzelzellschicht abgekratzten Kante ausgemessen (Abb. 3-2). Nach jeweils 3 h und 8 h wurde der Bereich der Kratzkante am Zeiss-Apotom neu vermessen. Für die Analyse wurde der abgekratzte Bereich des Inkubationsstarts vom neubesiedelten Bereich des Endpunktes (3 h bzw. 8 h) subtrahiert. Hierbei wurde die Distanz (μm) zwischen dem besiedelten und dem unbesiedelten Bereich bestimmt (Hidalgo *et al.*, 2005).

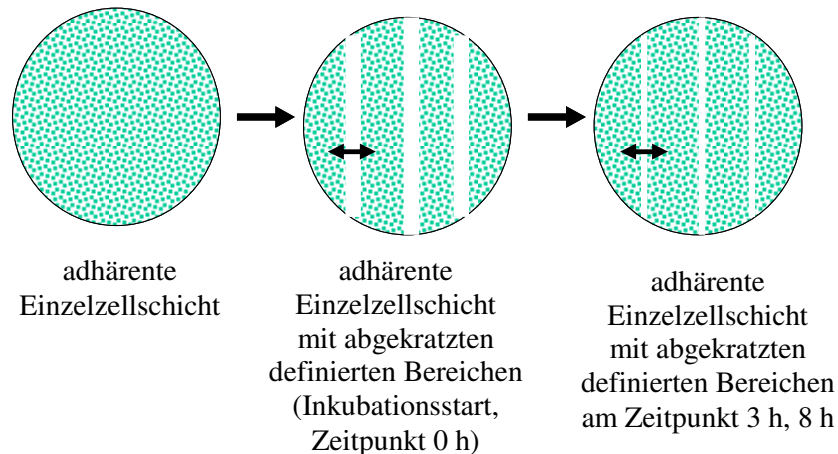


Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Scratch-Migrations-Assays

Zu Beginn wurden Einzelzellen auf adhären PS ausplattiert. Bei einer 80 %-Konfluenz wurde mit einer 1000 μM -Pipettenspitze ein definierter Bereich zum Zeitpunkt 0 gekratzt. Nach 3 h und 8 h wurde die unbesiedelte Distanz vermessen, um die neubesiedelte Fläche zu ermitteln.

3.6 Zellzahlbestimmung

Für die Messung der Zellzahl von CGR8-Einzelzellen wurden sechs Tage alte EBs aus der SF in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt und der Überstand abgenommen. Die EBs wurden mit 0,25 % Trypsin/EDTA vereinzelt und die Dissoziationsreaktion mit 5 ml CGR8-Komplettmedium gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension bei 800 x g für 4 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 3 ml Medium aufgenommen. Es wurden 8000 Zellen/9,2 cm^2 in 0,1 % gelatinebeschichtete 6-Lochplatten überführt. Am Tag 7 wurden die adhären Einzelzellen mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten sowie deren Kombination inkubiert. Es wurden mikroskopische Aufnahmen der adhären CGR8-Zellen mit dem Zeiss-Apotom an den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h und 26 h nach Inkubation angefertigt. Die CGR8-Zellanzahl wurde in einem Bereich von 0,01 cm^2 ausgezählt und die Zunahme der Zellen berechnet.

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen hätte auch der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium (MTS)-Test verwendet werden können, da die Stoffwechselaktivität bzw. die Anzahl der proliferierenden Zellen kalorimetrisch bestimmt werden können.

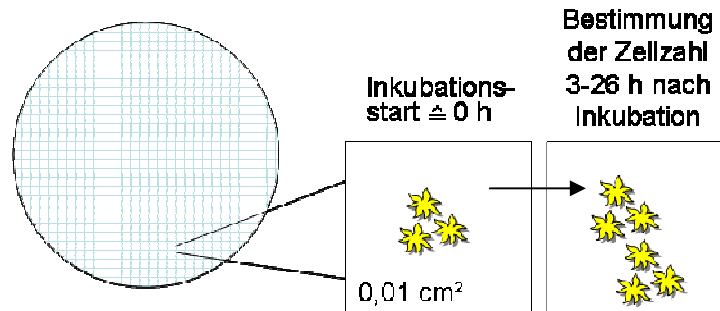


Abb. 3-3: Schematische Darstellung der Zellzahl-Messung

Zu Beginn wurden Einzellzellen auf adhärente PS ausplattiert. Die Zellzahl wurde in einem definierten Bereich von 0,01 cm² zum Zeitpunkt 0 ausgezählt. Nach 3 h - 26 h Inkubationszeit wurde die Zellzahl bestimmt.

3.7 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrische Messung gibt Aufschluss über die Zellgröße (FSC = *Forward scatter*) und Granularität der Zellen (SSC = *Side scatter*). Zur Analyse des Flk1⁺-GFP-Levels wurden E14Tg2a.4-EBs von Tag 0 - 10 der SF entnommen und in Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Absinken wurden die Zellen in Puffer (2 % FBS + PBS) gewaschen. Danach wurden die EBs mit 200 µl 0,25 % Trypsin/EDTA vereinzelt. Die Dissoziationsreaktion wurde mit 400 µl Puffer gestoppt. Bei RT wurde alles mit 800 x g für 4 min zentrifugiert und anschließend die Zellen in 1 ml Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch einen Filter (30 µm Porengröße, Miltenyi) getrennt, welcher mit 1 ml Puffer nachgespült wurde.

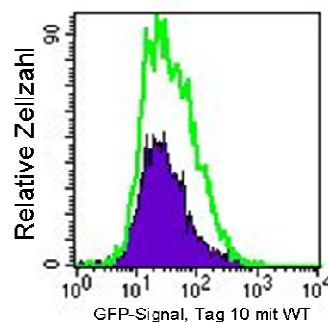


Abb. 3-4: Histogramm einer durchflusszytometrischen Messung

Dargestellt ist die relative Zellzahl der Flk1⁺-GFP-markierte E14Tg2.a (grün) und der WT-E14 (blau) ES-Zellen am Tag 10.

Zur Bestimmung der Flk1⁺-GFP-markierten Zellen wurden E14-EBs aus SF und PS mit 0,25 % Trypsin/EDTA vereinzelt und die enzymatische Reaktion mit 2 ml FACS-Puffer abgestoppt. Danach wurden die Einzelzellen zentrifugiert, erneut in FACS-Puffer aufgenommen, filtriert (30 µm Porengröße, Miltenyi), um sie anschließend durchflusszytometrisch mit dem FACSCalibur™ und der Software CellQuest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) zu analysieren. Dafür wurden 10.000 Ereignisse pro Messung erfasst. Als Referenz zu den E14Tg2a.4-GFP-Flk1-EBs dienten E14Tg2a.4-Wildtyp-EBs.

3.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Detektion der Fluoreszenz standen folgende Laser am cLSM Zeiss 510® Meta zur Verfügung: Helium/Neon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 543 nm (Anregung von Ethidiumhomodimer-2) und 633 nm (Anregung von Cy5), des Weiteren ein Argonlaser mit Anregungswellenlänge von 488 nm (Anregung von DCF, GFP, Cy2, DAF, CMFDA und FITC) und eine Diode für 405 nm Anregungswellenlänge (DAPI). Mit Hilfe der Bandpassfilter BP 505-570 IR (Cy2, DCF, DAF und FITC), BP 550-563 (Cy3, EthD-2) und des Langpassfilters LP 650 (Cy5) konnte detektiert werden. Folgende Objektive standen zur Verfügung: 10x NA (numerische Apparatur) 0,3; 20x-Objektiv NA 0,5; 40x-Objektiv NA 1,3 (Öl) sowie ein 63x-Objektiv NA 1,4 (Öl). Für die Berücksichtigung unspezifischer Antikörper (AK)-Bindung bzw. der Eigenfluoreszenz der Zellen wurden eine sekundäre AK-Probe sowie eine ungefärbte Probe mitgeführt. Die Fluoreszenz wurde im Bereich der max. Intensität detektiert. Für die Detektion von „whole mount“-EBs wurden Schnitte in der Z-Ebene bis 5 µm gemacht. Die einzelnen Schnitte wurden mittels Bildverarbeitungssoftware *Image LSM Examiner* von Zeiss® übereinandergelagert und analysiert.

3.8.1 Letalitätsnachweis mittels Ethidiumhomodimer-2

Das Ethidiumhomodimer-2 (EthD-2) diente der Analyse der Letalität von Zellen. EthD-2 passierte die permeable Zellmembran von nekrotischen Zellen und gelangte in den Zellkern. Hier interkalierte der Farbstoff in die DNA und konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 535 nm (Helium/Neon Laser) angeregt und bei 543 nm detektiert werden.

Vier Tage alte EBs wurden auf 24-Wellplatten mit 0,1 % gelatinebeschichteten Deckgläschen ausplattiert und ab Tag 4 mit unterschiedlichen Konzentrationen des PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten inkubiert (siehe Tab. 1). Zur Analyse der Zellletalität der Substanzen wurde die Aufnahme von EthD-2 in den inkubierten EBs an Tag 4+8 untersucht. Dafür wurde eine 2 μ M-Lösung EthD-2 in Kulturmedium verwendet. Als Positivkontrolle dienten EBs, welche zuvor 30 min in Methanol/Aceton 7:3 bei -20°C gelagert wurden. Für die Messung wurden 20 -30 adhärente EBs verwendet, diese wurden 30 min mit EthD-2 bei 37°C dunkel inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Färbelösung mit 1x PBS entfernt. Die Aufnahme der Zellen erfolgte mit dem 20x-Objektiv am cLSM Zeiss 510[®] Meta. Die Größe der EthD-2⁺-fluoreszierenden Fläche gibt die Höhe der Letalität an, d.h. je größer die fluoreszierende Fläche, desto höher die Letalität.

3.8.2 Messung von Stickstoffmonoxid

Der Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) mittels DAF-FM-Diacetat (4-Amino-5-Methylamino-2',7-Difluorescein-Diacetat) diente der Beurteilung des Einflusses von PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten sowie deren Kombination auf die Zellen. DAF-FM-Diacetat wurde von Kojima *et al.* 1998 entwickelt, um geringe Mengen von NO quantitativ nachzuweisen. DAF-FM-Diacetat ist passiv membrangängig und wird innerhalb der Zelle durch intrazelluläre Esterasen zu DAF-FM deacetyliert. Hierfür wurden ca. 30 vier-Tage-alte EBs auf nicht adhärente PS ausplattiert und an den Tag 4+2 gemessen. Das DAF-FM-Diacetat (50 μ g) wurde vor der Inkubation in 20 μ l DMSO (5 mM) gelöst und 1:1000 in E1-Puffer auf die EBs gegeben. Die zwanzigminütige Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ dunkel. Anschließend wurden die EBs in frischem E1-Puffer bei 37°C und 5 % CO₂ für 10 min für eine vollständige Deesterifikation des intrazellulären Diacetates aufbewahrt. Danach erfolgte die Messung am cLSM Zeiss 510[®] Meta bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und Emissionswellenlänge von 525 nm, 10x-Objektiv. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte EBs benutzt. Als Positivkontrolle diente 1 mM SNAP (S-Nitroso-N-Azetylpenicillamin), ein NO-Donor.

3.8.3 Messung von freien intrazellulären Sauerstoffradikalen

Um den Einfluss der zu testenden PPAR- γ -Agonisten (CGZ) und -Antagonisten (GW9662) sowie deren Kombination (siehe Tab. 1) auf die Freisetzung von intrazellulären, reaktiven Sauerstoffradikalen zu untersuchen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA (2', 7' Dichlorodihydro-Fluorescein Diacetat) verwendet. Durch die Azetatgruppe ist das

Molekül membrangängig. In der Zelle werden die Acetatgruppen durch Esterasen abgespalten. So kann das Molekül die Zelle nicht mehr verlassen. Freie Radikale abstrahieren die Wasserstoffatome, wodurch fluoreszierendes DCF entsteht. Diese Fluoreszenz wird bei 488 nm-Wellenlänge angeregt und mit 525 nm-Wellenlänge emittiert. Die nicht fluoreszierende Substanz H₂DCF wird durch die Gegenwart von ROS zu fluoreszierendem Dichlorofluoreszein (DCF) oxidiert (Hempel *et al.*, 1999; Halliwell und Whiteman, 2004). Das Vorhandensein von DCF ist ein unspezifischer Nachweis für freie Radikale, z. B. Stickoxide (Peroxinitrit) und Superoxide wie Hydroxylradikale (•OH) (Jakubowski und Bartosz, 2000). Unter lichtarmen Bedingungen wurden ca. 30 EBs pro Inkubation gemessen. Nach 48 h Inkubation der vier Tage alten EBs mit PPAR-γ-Agonisten und -Antagonisten wurden die EBs in separate Reaktionsgefäße gegeben und vor der Messung in 1 ml E1-Puffer mit 1:1000 verdünntem DCF (20 mM) für 20 min im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Proben vor der Messung in E1-Puffer aufgenommen. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte EBs und als Positivkontrolle EBs, welche mit 10 mM H₂O₂ 1 min vor der Messung stimuliert wurden. Nach 20 min Inkubationszeit erfolgte eine quantitative Endpunktmessung der EBs am cLSM Zeiss 510[®] Meta mittels Argon-Laser bei einer Anregung von 488 nm und Emissionswellenlänge von 525 nm (Halliwell und Whiteman, 2004), 10x-Objektiv. Anschließend wurde die mittlere Im Fluoreszenzintensität durch die Analysesoftware LSM Image Examiner (Zeiss) analysiert. Um die entstandenen freien Radikale während der Inkubation abzufangen, wurde 100 µM Trolox (Stock 100 mM) als Radikalfänger eingesetzt.

3.8.4 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden aus der SF vier Tage alte EBs auf adhärente bzw. nicht adhärente PS ausplattiert und mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Zur Analyse der spezifischen Proteine wurden die EBs zu den jeweiligen Zeitpunkten mit einem 7:3-Methanol/Aceton-Gemisch bei -20°C fixiert.

Die Aufnahme der Flk1⁺-GFP-Fluoreszenz von E14Tg2.a-ES-Zellen erfolgte am Tag 4+1. Zuvor wurden vier Tage alte E14Tg2.a-ES-Zellen auf 0,1 %-gelatinierte Deckgläschen ausplattiert und mit 10 µM CGZ, 10 µM GW9662 und deren Kombination kultiviert. Am Tag 4+2 wurden die E14Tg2.a-ES-Zellen in Methanol/Aceton 7:3 bei -20°C fixiert. Die Fluoreszenz wurde bei 488 nm detektiert.

Tab. 2: Verwendete Verdünnung von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen

primäre Antikörper			sekundäre Antikörper		
	Zeit	Verdünnung		Zeit	Verdünnung
CD31, Ratte anti-Maus, Chemicon	2 h/RT	1:100	Cy5-konjugiert anti-Ratte	ü.N. 4°C	1:100
α -SM-Aktin, Kaninchen anti-Maus, abcam	2 h/RT	1:200	Cy2-konjugiert anti-Ratte	ü.N. 4°C	1:200
Sarcoplasmatic α Aktinin, Maus anti-Maus (Sigma)	2 h/RT	1:200	Cy5-konjugiert anti-Maus	ü.N. 4°C	1:50
Hoechst (Invitrogen)	2 h/RT	1:50			

Für die verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen wurde das Kulturmedium abgenommen und die EBs mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurden die EBs in 1 ml eiskaltem Methanol/Aceton-Gemisch (7:3) für 1 h bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die EBs dreimal mit 0,01 % PBS-TritonX100 gewaschen und danach die EBs mit 100 μ l 10 %-iger Magermilchlösung für 1 h bei RT geblockt, um unspezifische Bindungen der AK zu verhindern. Die AK-Färbung erfolgte in 10 %-iger Milchpulverlösung nach Tab. 2. Vor der Messung am cLSM wurden die EBs dreimal mit 0,01 % PBS-TritonX100 gewaschen. Für die konfokalen *Laser Scanning Mikroskop* (cLSM)-Aufnahmen von adhären PS wurde die Flüssigkeit abgenommen, die PS mit Glyceringelatine benetzt und mit Deckgläschen (\varnothing 22 mm) bedeckt. Nach dem Trocknen der Gelatine wurden die Deckgläschen auf dem Boden der PS mittels heißem Skalpell ausgeschnitten.

3.9 Proteindetektion mittels Western Blot

3.9.1 Probennahme und Proteinbestimmung

Die inkubierten EBs wurden mit 1x PBS gewaschen und in 100-150 μ l Homogenisierungs-(HPI)-Puffer aufgenommen. Der Aufschluss der EBs erfolgte für jeweils 10 s durch zweimaligen Ultraschall. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße gefüllt und für die Weiterverarbeitung auf Eis bzw. für eine längere Lagerung bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels Bradford-Reagenz und der Messung der Absorption bei 595 nm. Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA). Dafür wurde

das Magelan[®]-Analyseprogramm (Tecan) durch Erstellung einer Regressionsgerade genutzt. Es wurden 75 µg Gesamtprotein pro Probe verwendet.

3.9.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS)-PAGE

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese verwendet (Tab. 3). Das Trenn-Gel und das /-gel wurden nach Lämmli zusammengesetzt (Lämmli, 1970). Die SDS-PAGE lief bei einer Spannung von 90 V, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, und anschließend bei 130 V. Die Lauffront wurde mittels bromphenolblauhaltigem SDS-Ladepuffer markiert. Bei jeder SDS-PAGE wurde 7 µl Kaleidoskop Proteinstandard mitgeführt.

Tab. 3: Verwendete SDS-Gele

Protein	Trenngel	Sammelgel
CD31 (130 kDa), Sarcoplasmatic α -Aktinin (100 kDa),	6 %	3 %
eNOS (140 kDa)	10 %	4 %
GAPDH (37 kDa), "α-smooth muscle actin" (42 kDa)	12 %	4 %
aktive Caspase 3 (17 kDa), Caspase 3 (35 kDa)	15 %	4 %
p27 ^{Kip1} (27 kDa)	15 %	4 %

Das „Nass“-Blotten des Gels auf die Nitrozellulosemembran erfolgte in 1x Transferpuffer bei 20 V und 4°C ü. N.. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit 10 %-iger Milchpulverlösung für 5 h bei 4°C geblockt. Ü. N. wurden die Membran mit den primären AK in 0,1 % PBS-Tween bei 4°C inkubiert und danach dreimal für jeweils 10 min in 0,1 % PBS-Tween gewaschen. Die Membran wurde mit dem sekundären "horseradish peroxidase" (HRP)-AK bei 4°C für 3 h inkubiert (Tab. 4).

Tab. 4: Verwendete Western Blot Antikörper

primärer Antikörper		sekundärer Antikörper	
mCD31 (R&D Systems)	1:500	anti-Ziege (ABBIOTEC)	1:1000
" α -smooth muscle actin" (abcam)	1:1000	anti-Kaninchen (Santa Cruz Biotech)	1:1000
Sarcoplasmatic α -Aktinin (Sigma)	1:500	anti-Maus (Santa Cruz Biotech)	1:1000
GAPDH (abcam)	1:1000	anti-Kaninchen (Santa Cruz Biotech)	1:1000
Anti p27 ^{Kip1} (abcam)	1:500	anti-Kaninchen (ABBIOTEC)	1:1000
Anti Phospho eNOS (Cell Signaling)	1:200	anti-Kaninchen (ABBIOTEC)	1:1000
Caspase 3 (Cell Signaling)	1:500	anti-Kaninchen (ABBIOTEC)	1:1000
Cleaved Caspase3 (Cell Signaling)	1:500	anti-Kaninchen (ABBIOTEC)	1:1000
Anti eNOS (BD Transduction Laboratories)	1:200	anti-Maus (Santa Cruz Biotech)	1:1000

3.9.3 Auswertung am LAS-3000 Lite

Zur Detektion der Membranen, welche mit einer verdünnten AK-Lösung inkubiert wurden, behandelten wir diese mit 1:1 Amersham „*ECL-Westernblotting detection reagents and analysis system*“ und entwickelten sie anschließend am LAS 3000 I_R. Die am LAS 3000 Lite (FUJIFILM) aufgenommenen Bilder der Nitrozellulosemembran wurden mittels Bio Rad Quantity One[®] 4.5.0 analysiert. Dabei wurde die prozentuale Adj. Vol. (*“adjusted volume”*) in das Microsoft[®] Excel-Programm übertragen. Das Zielprotein wurde gegen das *“house keeping”*-Protein verrechnet. Die relativen Werte wurden anschließend in Sigma Plot 12.0 als Diagramm dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad InStat 3 ein One-way ANOVA-Dunnett aufgetragen.

3.9.4 Strippen der Membran

Um die Membran für weitere AK-Reaktionen verwenden zu können, wurden diese in 67°C warmem *Stripping*-Puffer für 10 min und im Anschluss für 10 min bei RT inkubiert. Ein dreimaliges Waschen mit 0,1 % PBS-Tween schloss sich an.

3.10 Quantitative real time RT-PCR

3.10.1 Isolierung der mRNA

Für die Zeitreihen der mRNA-Expression von *polymerase IIa*, *PPAR-γ*, *-α* und *-β/δ* wurden Proben ab Tag 0 verwendet. Zum Nachweis der mRNA von *polymerase IIa*, *PPAR-γ*, *-α*, *-β/δ*, *ki67*, *hcn4*, *tbx5*, *nkx2.5* und *isl1* wurden ca. 30 EBs am Tag 4 aus der SF auf adhärenzte PS ausplattiert. Nach entsprechendem Stimulationszeitraum (4+2, 4+8 und 4+10) wurden die Proben dreimal mit 1x PBS gewaschen und in 600 µl Lyse (RLT)-Puffer (10 µl β-Mercaptoethanol (Sigma) pro 1 ml QIAGEN RLT-Puffer) aufgenommen. Der verwendete RLT-Puffer beinhaltet Guanidinthiocyanat, wodurch Proteine und RNasen inaktiviert bzw. denaturiert werden. Somit wird die Reinheit der gesamten RNA gewährleistet. Die Isolierung der mRNA wurde nach dem QIAGEN Qias shredder™- und QIAGEN RNeasy®-Protokoll durchgeführt. Die RNA-Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert. Die mRNA-Konzentration wurde mittels Dreifachbestimmung der optischen Dichte (OD) am SanoDrop®-Kisker mit dem Analyseprogramm ND-1000 V3.1.2. unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($c = OD_{260\text{ nm}} \times 40$) bestimmt.

3.10.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg mRNA eingesetzt. Der Mastermix ist Tab. 5 zu entnehmen. Hierbei wurde das Promega-Protokoll verwendet.

Die Proben wurden auf Eis pipettiert und die cDNA danach im Eppendorf-Mastercycler gradient mit folgender Einstellung synthetisiert: 10 min 70°C, 1 h 42°C und 5 min 95°C, die Deckeltemperatur betrug 42°C. Die cDNA-Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Tab. 5: Ansatz für Mastermix

RT-Puffer (10 x)	2 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Oligo dT-Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
RNasin RNase Inhibitor	0,5 µl
AMV-Reverse Transkriptase (10 u/µl)	0,5 µl

3.10.3 Quantitative *real time* RT-PCR

Für die quantitative *real time* RT-PCR wurde 1 µg synthetisierte cDNA eingesetzt. Es wurde ein Mastermix (Tab. 6) hergestellt. Der Primer-Mix setzte sich aus 3 µl Vorwärtsprimer, 3 µl Rückwärtsprimer und 94 µl RNase-freiem Wasser zusammen (Oligonukleotid-Sequenzen im Anhang).

In die 0,1 ml-Reaktionsgefäße (*"strips of 4 tubes and caps"*) von QIAGEN wurde das Gemisch pipettiert. Die Proben wurden mit dem QIAGEN Rotor-Gene mittels QIAGEN Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2. analysiert (Programm Tab. 7). SYBRTM Green[®] ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in die DNA interkaliert. Während der exponentiellen Phase der quantitativen RT-PCR erhöht sich die Fluoreszenz proportional zur amplifizierten DNA. Es wurde ein Schwellenwert (*"threshold"*) im Bereich der ansteigenden exponentiellen Phase festgelegt. Der für die Auswertung genutzte *"cycle threshold"* (C_t)-Wert ergibt sich aus dem Schwellenwert und dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve. Die relative Genexpression ($\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ polymerase IIa}$) wurde durch die relativen C_t-Werte der *polymerase IIa* zum Zielgen berechnet. Damit die Expressionslevel vergleichbar sind, wurden die Differenzen zwischen der *polymerase IIa* und dem Zielgen mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Livak und Schmittgen berechnet (Livak und Schmittgen, 2001).

Die relativen Unterschiede in der Expression des Zielgens verschieden behandelter Proben wurde aus der $Ratio = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ bestimmt. Die Annealingtemperatur der Primerpaare wurde wie folgt eingestellt: *PPAR-γ*, *PPAR-β/δ*, *PPAR-α* (59°C), *ki67* 58°C, *nkx2.5* 60°C, *hcn4* 60°C, *tbx5* 60°C, *isl1* 60°C (Tab. 7). Die Primerspezifität wurde mittels Schmelzkurve analysiert.

Tab. 6: Zusammensetzung des Mastermixes für die quantitative *real time* RT-PCR

Substanz	Menge
SYBR TM Green [®]	10 µl
H ₂ O	7 µl
Primer-Mix	2 µl
cDNA	1 µl

Tab. 7: Reaktionsbedingungen für die quantitative *real time RT-PCR* am Qiagen Rotor-Gene

Phasen	Temperatur	Dauer (40x)
Initialisierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	58°C, 59°C, 60°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Endelongation	72°C	5 min
Ende	4°C	

3.11 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels Tabellen- und Kalkulationsprogramm von Microsoft® Office Excel. Dafür wurden aus drei unabhängigen Experimenten die Mittelwerte (MW) sowie \pm gepoolte Standardabweichung (SD) als auch der Standardfehler (SEM) bestimmt. Das Statistikprogramm GraphPad InStat3 errechnete die dazugehörigen Signifikanzen mittels One-way ANOVA-Dunett. Die statistische Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ angenommen. Die Gestaltung der statistischen Graphen erfolgte in der Analyse- und Grafiksoftware SigmaPlot 12.0 von Synstat.

Die relativen Werte wurden anschließend in Sigma Plot 12.0 als Diagramm dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad InStat 3 ein One-way ANOVA-Dunett aufgetragen.

4 Ergebnisse

Um Aussagen zum Einfluss der PPAR- γ -Liganden auf die kardiovaskuläre Differenzierung treffen zu können, musste zuvor das Zeitfenster der Differenzierung von Flk1⁺-Progenitorzellen, der PPARs, der Endothelzellen sowie der glatten Muskelzellen in ES-Zellen bestimmt werden. Während der EB-Kultur der CGR8- und E14-Zelllinien verändern sich die Genexpression und das Proteinniveau in einem zeitlich streng ablaufenden Muster, welches der Differenzierung bzw. Proliferation von embryonalen Genen im murinen Embryo entspricht.

4.1 Charakterisierung der ES-Zelllinie und deren Differenzierung zu unterschiedlichen Zelltypen in der EB-Kultur

Für intensivere Analysen wurden dazu die mRNA-Expression und Proteinsynthese spezifischer Marker untersucht. Zur Bestimmung der Differenzierung von mesodermalen Vorläuferzellen wurde Flk1 (VEGFR-2) verwendet. Die Endothelzellen konnten anhand von CD31 (PECAM-1), welches zum größten Teil auf den interzellulären endothelialen Verbindungen ("junctions") lokalisiert ist (Albelda *et al.*, 1990) identifiziert werden. Um die glatte Muskulatur in dieser Arbeit nachzuweisen, nutzten wir die prädominanten Isoform α -SMA als Marker. Zudem erfolgte die Untersuchung der zeitlichen Expression der PPAR- α , - β/δ und - γ in CGR8-EBs.

4.1.1 Mesodermale Entwicklung während der EB-Entwicklung

Wir spürten Flk1⁺-Zellen über einen Zeitraum von Tag 2 – 10 auf und nutzten dazu die Durchflusszytometrie.

Für die Untersuchung der Flk1⁺-GFP-Fluoreszenz wurde die mES-E13Tg2a.4-Zelllinie (s. 3.1.1) verwendet. Diese trug GFP-markiertes Flk1⁺ und konnte daher zur fluoreszenzbasierten Detektion von Flk1⁺-Zellen mittels Durchflusszytometrie verwendet werden. Die ersten Flk1⁺-Zellen waren am Tag 2 detektierbar (Abb.4-1). Von Tag 3 -5 zeigte sich eine maximale Anzahl der Flk1⁺-Zellen. Abb. 4-1B zeigt, dass sich die Flk1⁺-Zellen in 5 Tage alten EBs zu vernetzen begannen und in *Clustern* auftraten.

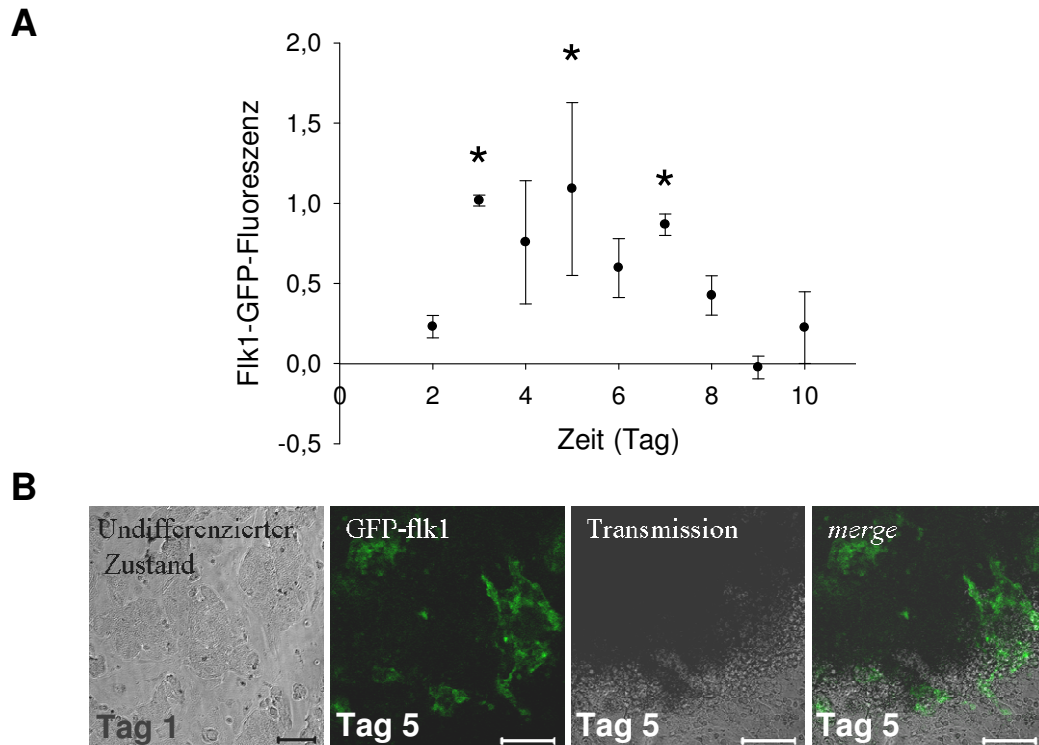


Abb. 4-1: Altersabhängige Flk1⁺-GFP-Fluoreszenz während der E14Tg2a.4-EB-Entwicklung
(A) **Bestimmung der Flk1⁺-GFP-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie:** Die Flk1⁺-GFP-Fluoreszenz in E14Tg2a.4-EBs wurde zum E14-WT bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegen Wert an Tag 2 * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. (B) **Transmissionsmikroskopie** von undifferenzierten E14Tg2a.4 (10x-Objektiv) und **Aufnahmen der GFP-Fluoreszenz** von Flk1⁺-Zellen (20x-Objektiv), am Fluoreszenzmaximum von adhärennten E14Tg2a.4-EBs am Tag 5. Der Maßbalken entspricht 50 μm .

4.1.2 Endotheliale Differenzierung während der EB-Entwicklung

Zum Nachweis der endothelialen Strukturen während der EB-Entwicklung verwendeten wir den intravaskulären Oberflächenmarker CD31 (*"platelet endothelial cell adhesion molecule-1"*, PECAM-1). Zur Untersuchung des CD31-Proteinniveaus mittels Western Blot und Immunfluoreszenz wurden Proben von CGR8-EBs aus der SF an den Tagen 4 -18 isoliert. Die Proteinsynthese von CD31 folgte einem biphasischen Verlauf, gekennzeichnet durch zwei Maxima, an den Tagen 5 -8 sowie am Tag 18 (Abb. 4-2A).

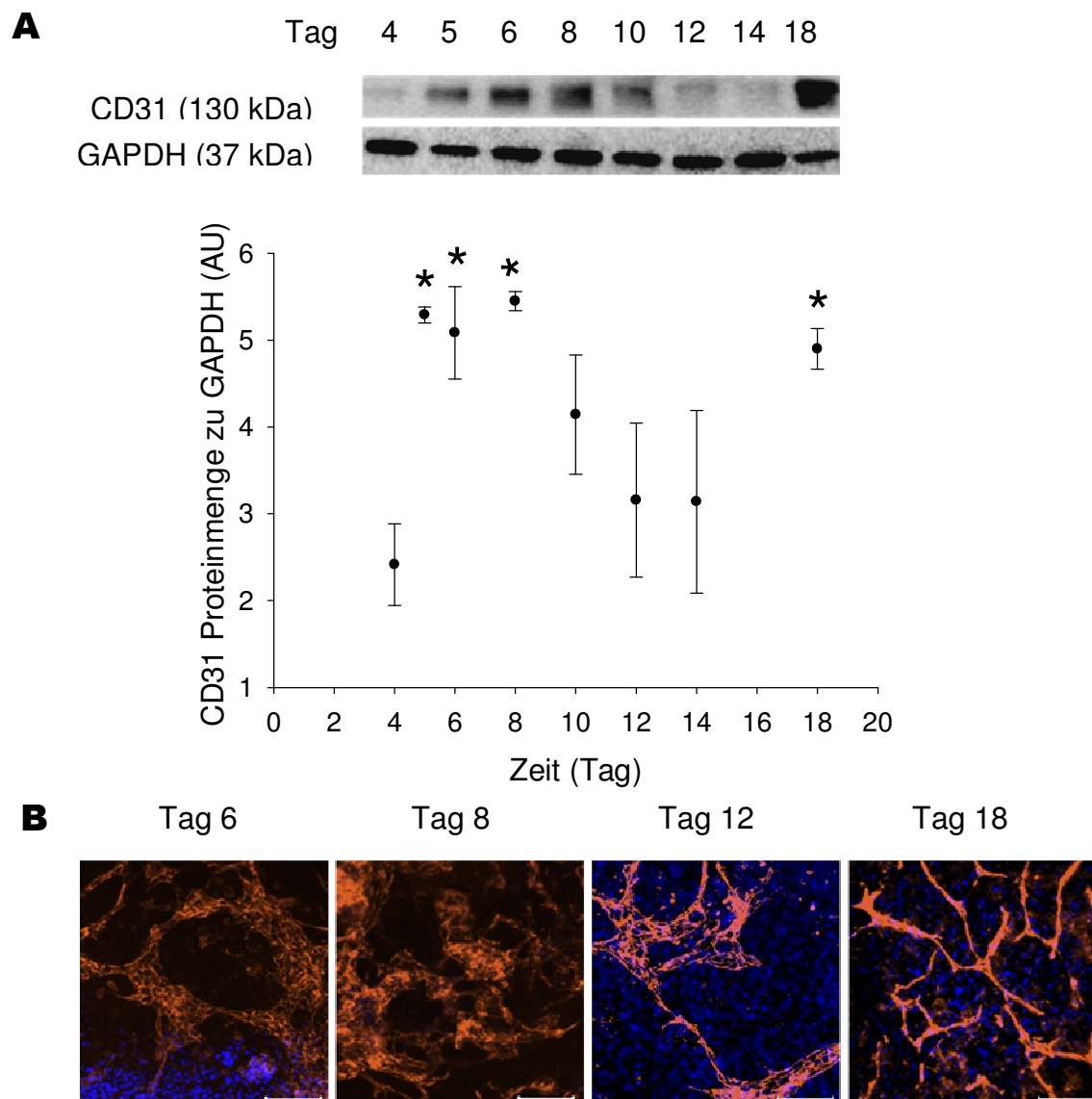


Abb. 4-2 A/B: Altersabhängige Synthese von CD31 während der EB-Entwicklung

(A) Bestimmung der Proteinmenge mittels Western Blot (*arbitrary units* (AU)): In zeitlicher Abhängigkeit wurden die relativen Proteinmengen von CD31 zum *"house keeping"*-Protein GAPDH aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert am Tag 4 * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. **(B) Immunfluoreszenz** während der EB-Entwicklung. Dargestellt sind repräsentative Bilder mit CD31 (rot), Zellkernfärbung mittels DAPI (blau). Der Maßbalken entspricht 100 μm .

Die Immunfluoreszenz zeigte erste CD31⁺-Zellen am Tag 6 (Abb. 4-2A), welche sich im Laufe der EB-Entwicklung zu einem stark verzweigten Netzwerk differenzierten (Abb. 4-2B). Somit wurde eine forcierte Endothelzelldifferenzierung zwei Tage nach Beginn der mesodermalen Differenzierung beobachtet im Vergleich zu Abb. 4-1.

4.1.3 Differenzierung der glatten Muskulatur während der EB-Entwicklung

Die glatte Muskulatur als kontraktile Bestandteil von Blutgefäßen kann aus epikardialen Muskel- und Gefäßvorläuferzellen bestehen (Carmeliet und Jain, 2000). Die Synthese von α -SMA in ES-Zellen wurde mittels Western Blot und Immunfluoreszenz analysiert. Wie durch Abb. 4-3 deutlich wird, setzte die α -SMA-Synthese am Tag 6 ein und erreichte ein Maximum an den Tagen 10 - 14 (Abb. 4-3A). Die Immunfluoreszenz zeigte erste sehr wenige α -SMA⁺-bildende Strukturen am Tag 5, welche sich im Laufe der EB-Entwicklung ab Tag 10 zu einem filamentösen Netzwerk entwickelten (Abb. 4-3B).

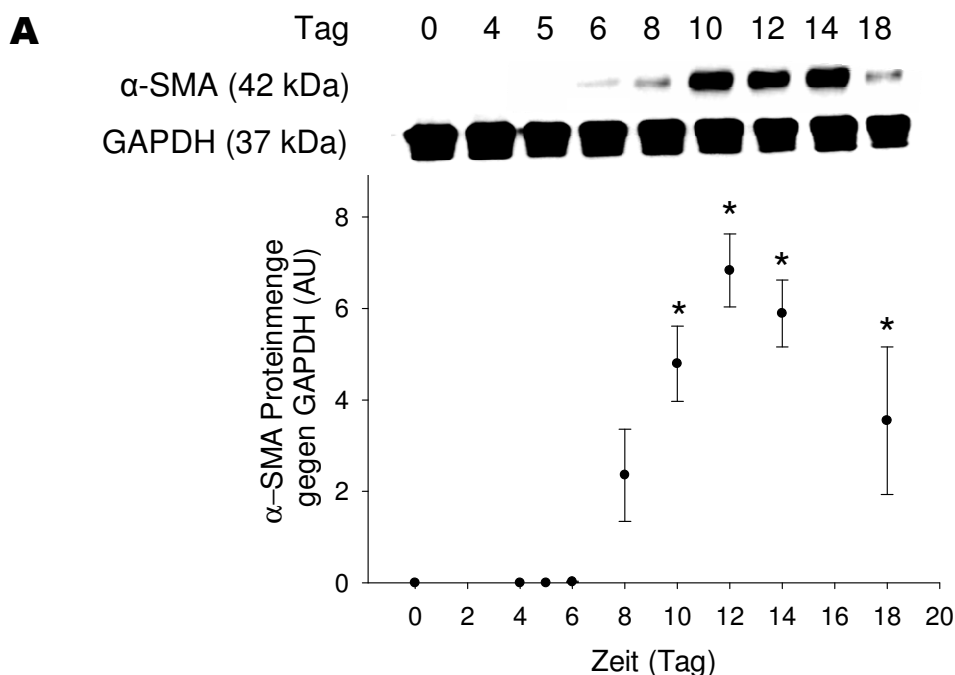


Abb. 4-3 A: Altersabhängige Synthese von α -SMA während der EB-Entwicklung

(A) Bestimmung der Proteinmenge mittels Western Blot (AU): In zeitlicher Abhängigkeit wurde die relative Proteinmenge von α -SMA zum „house keeping“-Protein GAPDH aufgetragen. Es wurden 70 μ g Gesamtprotein je Probe eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert am Tag 0 * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test.

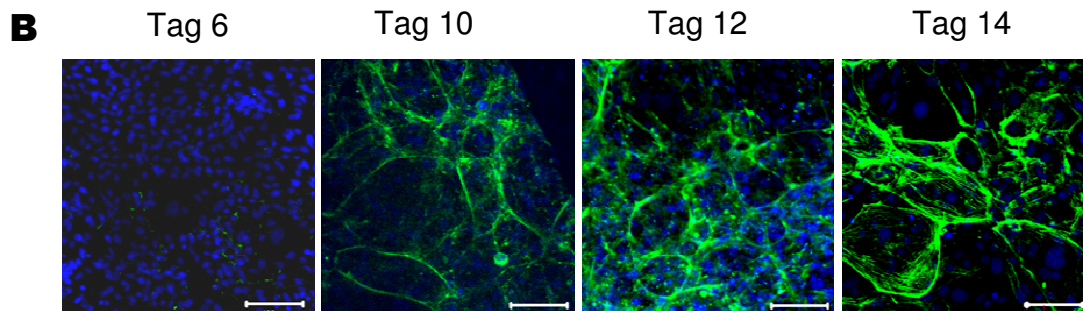


Abb. 4-3 B: Immunfluoreszenz von α -SMA während der EB-Entwicklung

B) Immunfluoreszenz von α -SMA. Dargestellt sind repräsentative Bilder mit Zellkernfärbung (DAPI, blau) und α -SMA (grün). Der Maßbalken entspricht 100 μ m.

Im längerfristigen Vergleich der Flk1- und der CD31-Differenzierung wird erkennbar, dass die Entwicklung der mesodermalen und endothelialen Zellen vor der glatten Muskulatur erfolgt (vergleiche mit Abb.4-1A und Abb.4-2A).

4.1.4 Altersabhängige Expressionen von $PPAR-\alpha$, $-\beta/\delta$, $-\gamma$

Die altersabhängige „*peroxisomen proliferation activated receptors*“ (PPARs)-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer *real time RT-PCR* analysiert. Abb. 4-4 zeigt die mRNA-Expression der PPARs während der Kultivierung von mES-CGR8-Zellen in unterschiedlichen Mengen und Zeitpunkten (Abb. 4-4). Der Zeitpunkt 0 entspricht der Kultivierung der CGR8-mES-Zellen mit LIF.

Die Verläufe der gemessenen mRNA-Expression einzelner PPARs unterscheiden sich sehr voneinander. Während der EB-Entwicklung im Zeitraum von Tag 0 - 18 erfolgte an den Tagen 4 - 10 eine Herunterregulation der $PPAR-\alpha$ -mRNA-Expression, gefolgt von einer erhöhten Genexpression an den Tagen 12 und 14 (Abb. 4-4A). Die $PPAR-\beta/\delta$ -mRNA-Expression verlief von Tag 0 - 4 auf einem geringen Expressionsniveau, stieg am Tag 6 auf ein Maximum an und fiel dann bis Tag 12 wieder auf ein basales Niveau ab (Abb. 4-4B).

Die *PPAR-γ*-Expression zeigte einen biphasischen Verlauf und war an den Tagen 6 - 8 und am Tag 18 signifikant erhöht (Abb. 4-4C). Das erste Maximum entsprach der Hälfte des *PPAR-β/δ*-Genexpressionslevels, wohingegen das zweite Maximum eine doppelte mRNA-Menge im Vergleich zu *PPAR-β/δ* und eine vierfache zu *PPAR-α* aufwies (Abb. 4-4C).

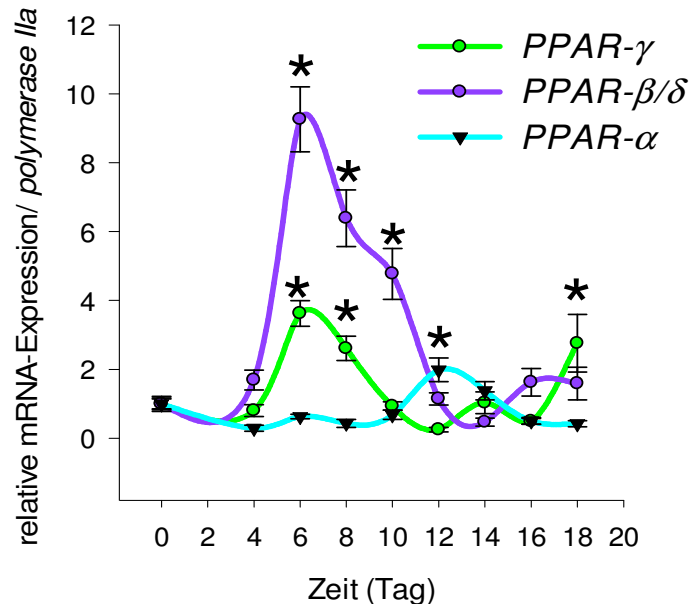


Abb. 4-4: Relative *PPAR* mRNA-Expression während der EB-Entwicklung

Bestimmung der relativen mRNA-Expression mittels quantitativer *real time RT-PCR* von *PPAR-α*, *PPAR-β/δ* und *PPAR-γ*, zum endogenen Standard *polymerase IIa* im zeitlichen Verlauf der EB-Kultivierung. Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolte Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert am Tag 0 * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test.

4.2 Einfluss von *PPAR-γ*-Liganden auf die EB-Entwicklung

4.2.1 Untersuchung der Zytotoxizität der *PPAR-γ*-Liganden

Um eine nicht letale Konzentration der zu untersuchenden Substanzen für die Folgeexperimente zu ermitteln, musste eine zytotoxische Wirkung auf die ES-Zellen ausgeschlossen werden. Dazu wurde der zytotoxische Einfluss der *PPAR-γ*-Liganden auf den EB durch Detektion von nekrotischen und apoptotischen Zellen analysiert. Es wurden die Tage 4+8 gewählt, da zu diesem Inkubationszeitpunkt die Endothelzellen, die Kardiomyozyten und die glatten Muskelzellen im EB beobachtet werden konnten (s. Abb. 4-2, Abb. 4-3).

Für die Untersuchung der Toxizität von Ciglitazon und GW9662 wurde Ethidiumhomodimer-2 (EthD-2) verwendet, was zum Nachweis der Zellletalität dient. Zur

Ermittlung der toten Zellen im EB wurde die absolute EthD-2⁺-fluoreszierende Fläche gemessen. Nach Zugabe von 50 µM **CGZ** konnte ein signifikanter Anstieg der EthD-2⁺-fluoreszierenden Fläche um das Doppelte beobachtet werden (Abb. 4-5A). Hingegen zeigten die Proben, welche mit 1 µM und 10 µM **CGZ** inkubiert worden waren, keinen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle in der EthD-2⁺-fluoreszierenden Fläche. Nach Zugabe von **GW9662** in drei verschiedenen Konzentrationen (1 µM, 2 µM und 10 µM) wurde keine Letalität der Zellen beobachtet (Abb. 4-5B). Bei gleichzeitiger Behandlung der EBs mit 10 µM **GW9662** und 10 µM **CGZ** konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der EthD-2⁺-fluoreszierenden Fläche zur DMSO-Kontrolle detektiert werden. Aus diesem Grund wurden 10 µM als Konzentration der jeweiligen Substanzen für die nachfolgenden Experimente verwendet.

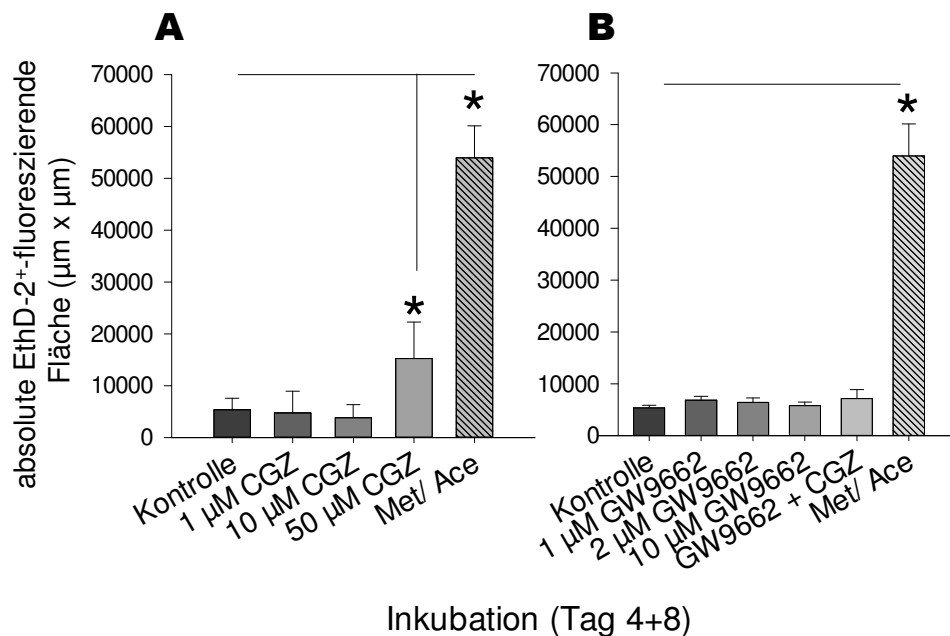


Abb. 4-5 A/B: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Letalität der ES-Zellen

Bestimmung des Anteils der fluoreszierenden EthD-2⁺-Fläche, welche dem Anteil nekrotischer ES-Zellen in adhären EBs entspricht. Der Letalitätsnachweis von adhären EBs (Tag 4+8) erfolgte nach Inkubation mit (A) **Ciglitazon** (1 µM, 10 µM, 50 µM), (B) **GW9662** (1 µM, 2 µM, 10 µM) und einer Kombination aus 10 µM **GW9662** und 10 µM **CGZ** mittels fluoreszierendem Ethidiumhomodimer-2. Als positive Kontrolle dienten in 7:3 Methanol/Aceton-fixierte EBs. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der DMSO-Lösungsmittelkontrolle am Tag 4+8 * p<0,05 mittels One-way-ANOVA-Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Um zu untersuchen, ob die PPAR-γ-Liganden die Apoptose in ES-Zellen induzieren, wurde der *Caspase3-Assay* durchgeführt. Die Caspase3 dient hierbei als Marker, welche während der Apoptose-Signalkaskade gespalten und somit aktiviert wird. Es wurde das Verhältnis von aktiven *cleaved* Caspase3 zur inaktiven Caspase3 ermittelt (Abb. 4-6). Die

Behandlungen der EBs mit 10 μ M CGZ sowie mit 10 μ M GW9662 hatten keinen Einfluss auf die Caspase3-Aktivität. Auch die Inkubation mit den beiden Substanzen in den verwendeten Konzentrationen von 10 μ M bewirkte keine signifikant erhöhte Caspase3-Aktivität und bestätigen die Ergebnisse aus der EthD-2-Messung (s. Abb. 4-5).

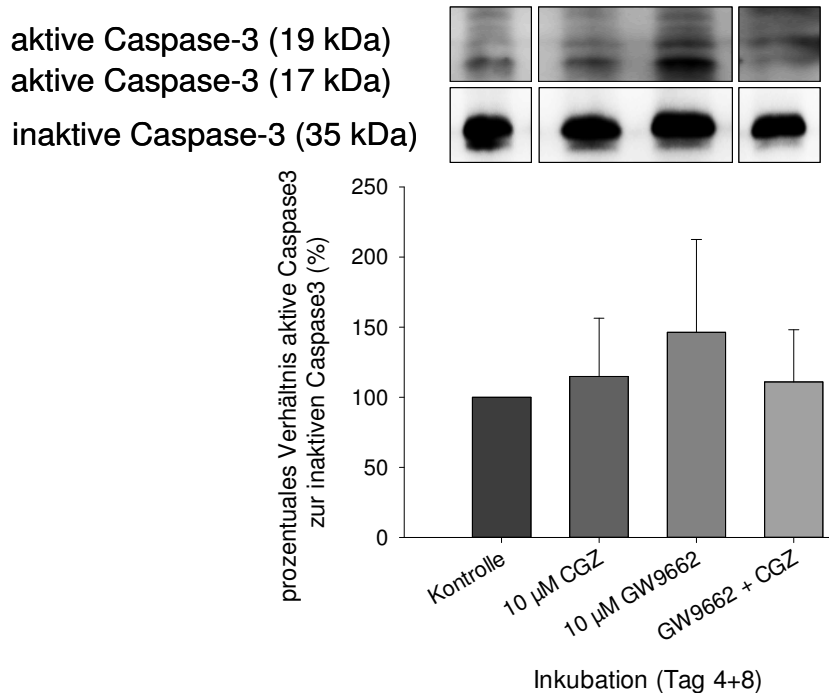


Abb. 4-6: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Apoptose im EB

Um die apoptotische Wirkung von PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten zu untersuchen wurden vier Tage alte EBs auf adhärennten PS für 8 Tage (Tag 4+8) inkubiert und mittels *Caspase3-Assay* auf das Vorhandensein von apoptotischen Zellen untersucht. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

4.2.2 Einfluss der PPAR- γ -Liganden auf die Proliferation und Migration der differenzierten Zellen im EB

Um die Migration von differenzierten CGR8-Zellen nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden zu untersuchen, wurde der *Scratch-Assay* verwendet. Die Bestimmung der wiederbesiedelten Fläche bzw. des Spaltschlusses wurde durch die Messung der Spaltkanten zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h und 8 h vollzogen. Es wurde beobachtet, dass die Inkubation der Zellen mit 10 μ M CGZ nach 3 h eine verglichen mit der DMSO-Kontrolle größere wiederbesiedelte Fläche verursachte. 8 h nach dem Versuchsbeginn war dieser signifikante Unterschied nicht mehr vorhanden. Dennoch wiesen hier die mit 10 μ M CGZ inkubierten Zellen tendenziell eine im Vergleich zu den Kontrollzellen stärkere wiederbesiedelte Fläche auf. Die Behandlung mit 10 μ M GW9662 zeigte 3 und 8 h keine

signifikanten Unterschiede zur Kontrolle bezüglich der wiederbesiedelten Fläche (Abb. 4-7). Die Inkubation mit deren **Kombination** aus Agonisten und Antagonisten resultierte in einer leicht größeren wiederbesiedelten Fläche im Vergleich zur Kontrolle. Nach 10 h war bei allen Inkubationen eine zu 100 % wiederbesiedelte Fläche zu beobachten.

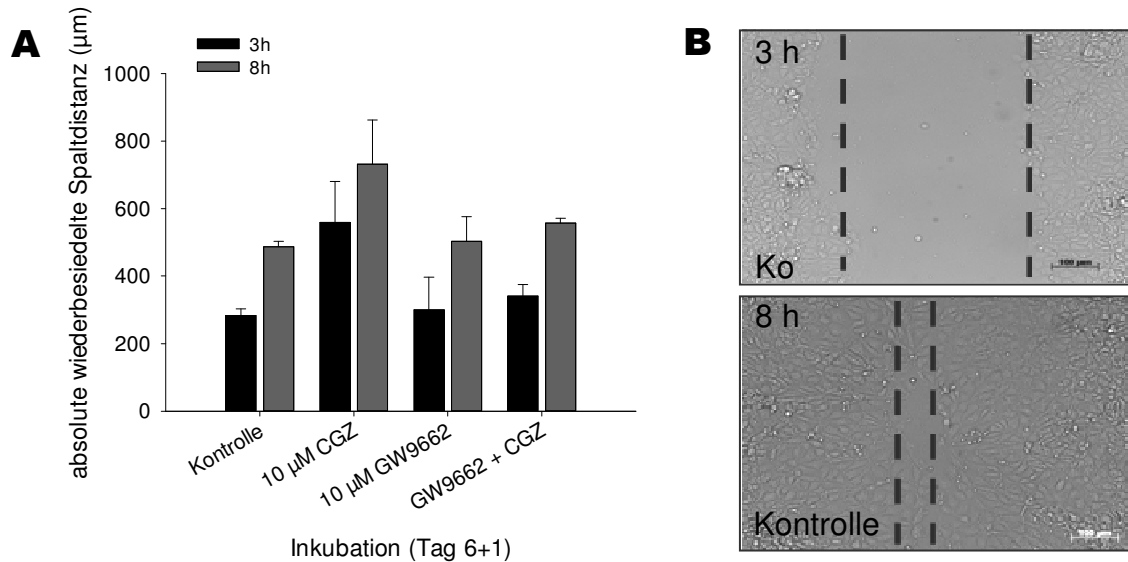


Abb. 4-7: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Migration differenzierter Zellen

Zur Untersuchung der Migration wurden sechs Tage alte EBs aus der SF vereinzelt, auf 6-Lochplatten ausplattiert und Tag 6+1 mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten inkubiert. Ein definierter Bereich des Zellrasens wurde abgekratzt und vermessen. Nach 3 und 8 Stunden wurde dieser Bereich erneut ausgemessen. **(A)** Quantitative Auswertung der Wiederbesiedlung zum Zeitpunkt 3 h und 8 h nach dem Kratzen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz normalisiert gegenüber den DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierten ES-Zellen. **(B)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Kontrolle (Ko) zum Zeitpunkt 3 h und 8 h nach dem Kratzen (10x-Objektiv). Maßstab entspricht 100 μ M.

Aufgrund der Beobachtungen im *Scratch-Migrations-Assay* sollte die Proliferation der ES-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Substanzen über die Analysen der *ki67*-mRNA-Expression und des p27^{Kip1}-Proteinlevels untersucht werden. Die mRNA-Expression von *ki67* kann ebenso wie das Ki67-Proteinlevel zur Bestimmung der Proliferation verwendet werden (Möller *et al.*, 2009). Die Untersuchung des Ki67-Proteinniveaus konnte nicht gemessen werden, da es eine Halbwertszeit von 60 min nach der Mitose hat und anschließend degradiert wird (Christgen *et al.*, 2014).

Eine signifikante Erhöhung der *ki67*-mRNA-Expression wurde durch die Zugabe von 10 μ M **CGZ** auf das Dreifache und von 10 μ M **GW9662** auf das Doppelte festgestellt (Abb. 4-8A). Im Gegensatz dazu resultierte die Inkubation mit deren **Kombination** aus

PPAR- γ -Liganden in keiner erhöhten *ki67*-mRNA-Expression, sondern wies einen den kontrollzellenähnlichen Wert auf (Abb. 4-8A).

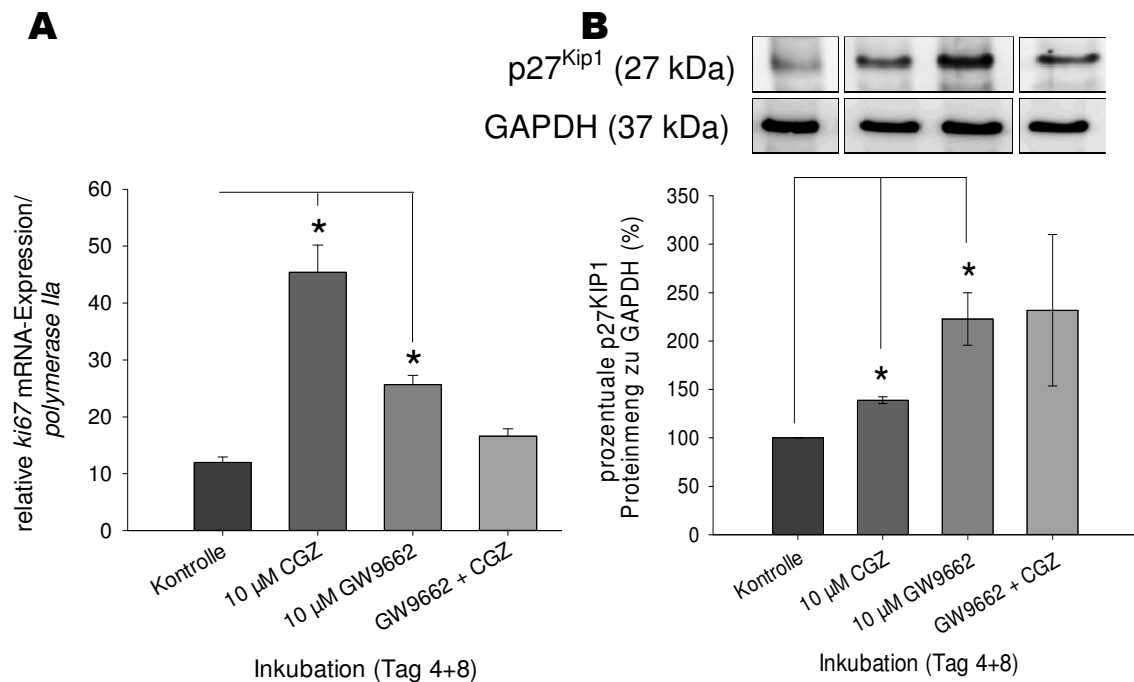


Abb. 4-8: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Proliferation der Zellen im EB

(A) **Nachweis der *ki67*-Expression** mittels quantitativer *real time RT-PCR* am Tag 4+8 der Inkubation mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonist normalisiert zum endogenen Standard *polymerase IIa*. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz normalisiert gegenüber Wert der Kontrolle am Tag 4+8 * $p < 0,05$ mittels ANOVA-Test. (B) **Repräsentativer Western Blot von p27^{Kip1}** (27 kDa) und dem endogenen Standard GAPDH (37 kDa). Nachweis von p27^{Kip1} am Tag 4+8 nach Zugabe von PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten. Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolte Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber der Kontrolle am Tag 4+8 * $p < 0,05$ mittels ANOVA Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Für die Untersuchung des Zellzyklus-Arrests wurde p27^{Kip1} (CDKN1B/Cyclin-unabhängiger Kinaseinhibitor 1B) verwendet, und die Proteinanalyse erfolgte mittels Western Blot. Die Inkubation mit 10 μ M CGZ führte zur 1,5-fachen und mit 10 μ M GW9662 zur 2,5-fachen signifikanten Erhöhung von p27^{Kip1}. Wie auch für *ki67* beobachtet wurde, induzierte die **gleichzeitige Behandlung** der EBs mit 10 μ M CGZ und 10 μ M GW9662 keine signifikante Änderung des Proteinlevels von p27^{Kip1}. Jedoch war eine tendenzielle Erhöhung mit CGZ und GW9662- verglichen zur Kontrolle- erkennbar (Abb. 4-8B).

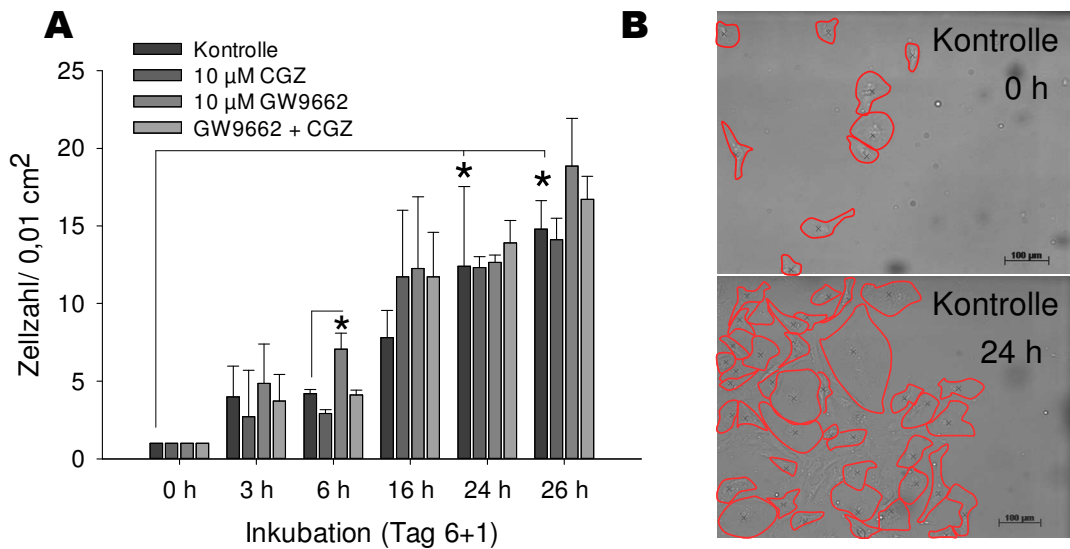


Abb. 4-9: Einfluss von Ciglitazon und GW9662 auf die Zellzahl der CGR8-Einzelzellen

(A) Die 8000 CGR8-Einzelzellen/9,2 cm² wurden am Tag 6 auf 6-Lochplatten ausgesät und am Tag 7 mittels Auszählung der adhärenierten Zellen die Zellmenge auf 0,01 cm² von 0 h - 26 h bestimmt. (B) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h und 24 h nach Versuchsbeginn (10x-Objektiv). Maßstab entspricht 100 µm. Rotmarkiert die Zellen.

Die Messung der Zellzahl der CGR8-Einzelzellen mittels Auszählungsverfahren erfolgte am Tag 7, dem Zeitpunkt der maximalen PPAR- γ -Expression. Abb. 4-9 zeigt einen signifikanten Anstieg der Kontrollzellzahl im Vergleich zum Inkubationsbeginn und den Zeitpunkten 24 h und 26 h. Zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 26 h nach Inkubationsstart beobachteten wir eine leichte Reduktion der Zellzahl durch 10 µM CGZ. Die Behandlung mit den PPAR- γ -Liganden führte zum Zeitpunkt 6 h zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl nach Zugabe von 10 µM GW9662. Die Inkubation mit der **Kombination** aus 10 µM GW9662 und 10 µM CGZ hatte eine tendenzielle Reduktion der Zellzahl zum Zeitpunkt 6 h zur Folge (Abb. 4-9).

4.2.3 Größenveränderung der EBs während der Kultivierung

Die Untersuchung der Durchmesser der *embryoid bodies* während der unterschiedlichen Kultivierungsmöglichkeiten und Inkubationen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Abb. 4-10 zeigt einen sigmoidalen Verlauf der Durchmesserzunahme. Zu Beginn wurden $1 \cdot 10^7$ Einzelzellen mit einem Durchmesser von 18 µm in die SF bzw. bakteriologischen PS eingesät. Im Anschluss bildeten sich kleine Zellaggregate durch das Anheften einzelner Zellen aneinander, welche sich im Laufe der Kultivierungszeit vergrößerten, z. B. durch Bildung von Vakuolen und die Zunahme der Zellmenge (s. 4.2.2). Bis Tag 4 vergrößerte

sich der Durchmesser der EBs in der SF um das 25-fache und in der PS um das 21-fache (Abb. 4-10A). Der Effekt der PPAR- γ -Liganden auf die Größe der EBs wurde von Tag 4 - 4+4 gemessen, da eine Stagnation der Größe ab Tag 4+2 zu beobachten war und die maximale PPAR- γ -Expression am Tag 8 nachgewiesen wurde (vergleiche Abb. 4-10A und B).

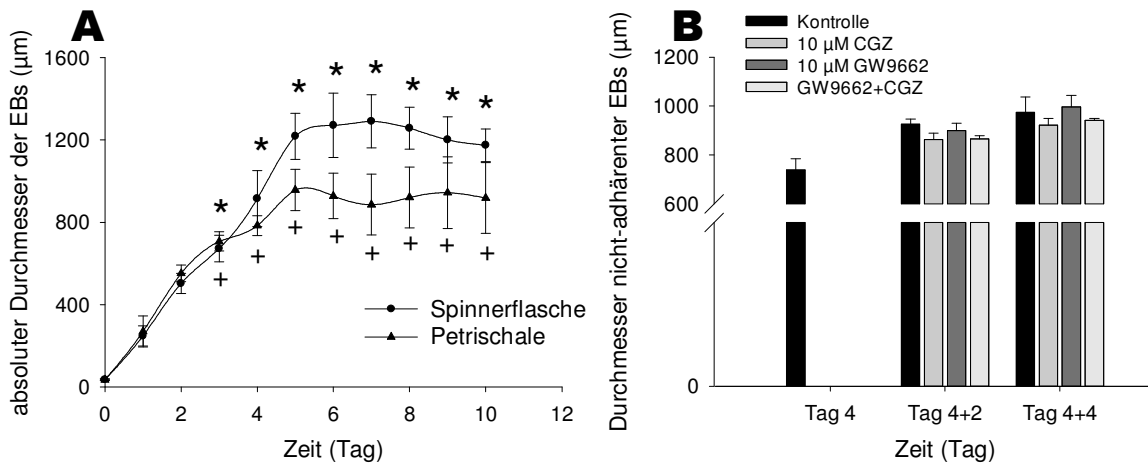


Abb. 4-10: Größenveränderung der *embryoid bodies* (µm)

(A) Vergleich Spinnerflaschen- und Petrischalenkultivierung über die Zeit. Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolte Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber der Kontrolle am Tag 0 (SF) * $p < 0,05$, (PS) + $p < 0,05$ mittels ANOVA-Test. (B) Einfluss des PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten am Tag 4 (entspricht dem Beginn der Inkubation), Tag 4+2 und Tag 4+8. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Eine leichte Verringerung der Durchmesser wurde bei den Inkubationen mit 10 µM **CGZ** im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abb. 4-10). Die Inkubation mit dem PPAR- γ -Antagonisten 10 µM **GW9662** hatte einen tendenziell vergrößernden Effekt auf den Durchmesser der EBs. Die **Kombination** aus GW9662 und CGZ führte zu einer Verringerung der EB-Durchmesser (Abb. 4-10B).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass der PPAR- γ -Agonist CGZ signifikant erhöhend auf die *ki67*-mRNA-Expression und die p27^{Kip1}-Proteinsynthese wirkt. Es konnte ebenso ein schneller Spaltschluss im *Scratch-Assay* zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden. Der PPAR- γ -Antagonist GW9662 führte ebenso wie CGZ zur signifikanten Erhöhung der *ki67*-mRNA-Expression und des p27^{Kip1}-Proteinlevels. Zudem konnte durch die Zugabe des PPAR- γ -Antagonisten GW9662 die Zellzahl von CGR8-Einzelzellen und der Durchmesser von EBs zur DMSO-Kontrolle erhöht werden.

4.2.4 Einfluss der PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten auf die Expression der PPARs

Die Effekte der PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten sowie deren Kombination auf die Subtypen der PPAR-Familie wurde mittels quantitativer *real time RT-PCR* analysiert. Die EBs wurden ab Tag vier auf adhärenenten PS kultiviert und inkubiert.

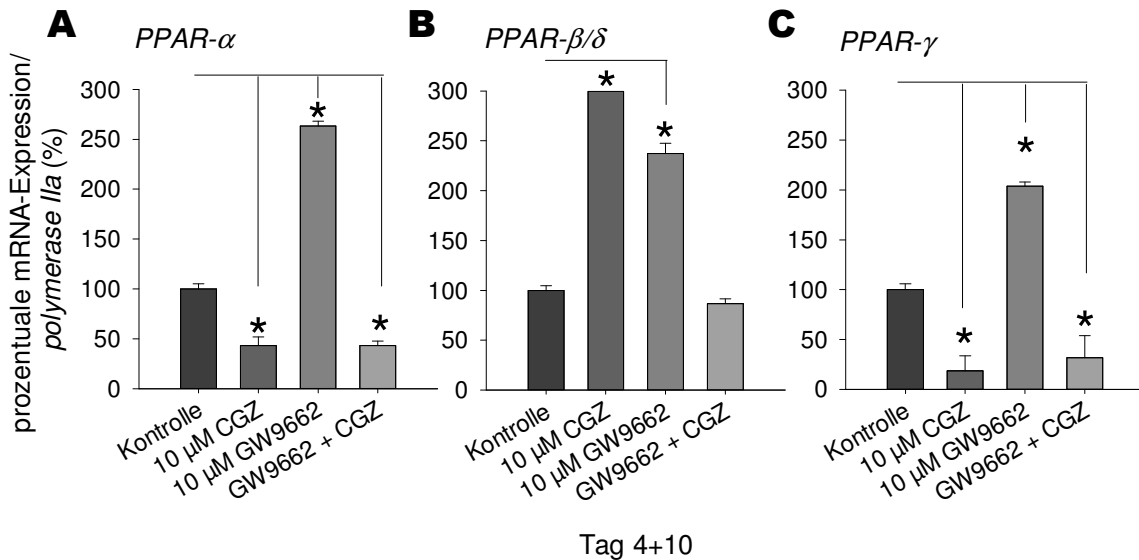


Abb. 4-11: Prozentuale PPAR-mRNA-Expression nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden
Messung der prozentualen PPAR-mRNA-Expression nach Inkubation mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten mittels quantitativer *real time RT-PCR* von adhärenenten EBs normalisiert gegen den endogenen Standard *polymerase IIa* als "house keeping"-Gen. (A) Expression von PPAR- α , (B) PPAR- β/δ und (C) PPAR- γ . Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolte Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der Kontrolle des Tages 4+10 * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Die PPAR- α -mRNA-Expression wurde am Tag 4+10 signifikant nach Inkubation mit CGZ allein sowie in Kombination mit GW9662 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verringert (Abb. 4-11A). Nach Inkubation mit 10 μ M GW9662 zeigte sich hingegen eine signifikante Steigerung der PPAR- α -mRNA. Die Inkubation mit 10 μ M CGZ sowie mit 10 μ M GW9662 führte jeweils zu einer signifikanten Erhöhung der PPAR- β/δ -mRNA-Expression (Abb. 4-11B). Die Behandlung mit einer Kombination aus 10 μ M GW9662 und 10 μ M CGZ hatte keinen Effekt auf die PPAR- β/δ -mRNA-Expression. Die Expression der PPAR- γ -mRNA war dagegen ähnlich wie bei PPAR- α nach der Behandlung mit 10 μ M GW9662 signifikant erhöht, wohingegen 10 μ M CGZ sowohl allein als auch in Kombination mit 10 μ M GW9662 eine deutliche Verringerung der Expression bewirkte (Abb. 4-11C).

4.2.5 Effekt der PPAR- γ -Liganden auf Flk1⁺-Zellen

Die Untersuchung von Flk1⁺-GFP-markierten E14Tg2.a ES-Zellen fand nach der Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten CGZ und dem PPAR- γ -Antagonisten GW9662 am Tag 4+2 mittels Durchflusszytometrie statt. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, weil er das Maximum von Flk1⁺-mesodermalen Progenitorzellen erwarten ließ (s.Abb.4-1).

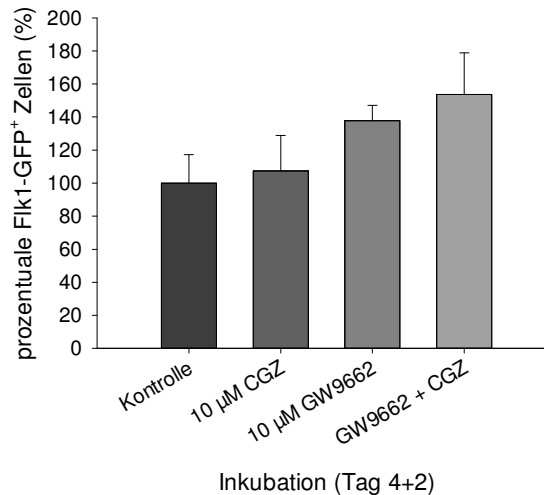


Abb. 4-12: Flk1-Synthese während der embryonalen Entwicklung

Nachweis der Flk1⁺-GFP E14Tg2a.4-Zellen am Tag 4+2 nach 48 h Inkubation mit 10 μ M CGZ und 10 μ M GW9662 sowie deren Kombination mittels durchflusszytometrischen Messverfahrens. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen.

Hierbei war keine signifikante Veränderung der Flk1⁺-Zellen nach Zugabe von 10 μ M **CGZ** bzw. 10 μ M **GW9662** zu beobachten (Abb. 4-12). Desgleichen hatte die **Kombination** aus GW9662 und CGZ (10 μ M) keinen signifikanten Anstieg der Flk1⁺-GFP-Zellen am Tag 4+2 zur DMSO-Kontrolle (Abb. 4-12).

4.2.6 Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die Kardiomyogenese

Um den Effekt des PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten auf die Funktionalität von Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden verwendet. Zum einen wurde die Anzahl kontrahierender EBs, die Frequenz der Kontraktionen der sich differenzierenden Kardiomyozyten (*beats per minute* = bpm), die ROS-Bildung, welche ein Differenzierungssignal für die Kardiogenese ist, und zum anderen die Expression von embryonalen kardialen Genen bestimmt.

4.2.6.1 Untersuchung der kontrahierenden "embryoid bodies"

Für die Analyse der Anzahl kontrahierender EBs wurden vier Tage alte EBs auf adhärente PS ausplattiert und für weitere 8, 10, 12 und 14 Tage mit den PPAR- γ -Liganden inkubiert.

Die Behandlungen mit **CGZ** zeigte eine Reduktion der Anzahl kontrahierender EBs. Die Inkubation mit 10 μ M CGZ (Abb.4-13A) resultierte an den Tag 4+10 um 28 % und an den Tag 4+12 um 40 % in einer signifikanten Reduktion der Anzahl kontrahierender EBs. Zudem erzeugten 10 μ M CGZ an den Tagen 4+8 und 4+14 keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die 1 μ M CGZ-Inkubation führte an den Tagen 4+8 zu einer 44 %-igen und am Tag 4+14 zu einer 70 %-igen Reduktion der Anzahl kontrahierender EBs (Abb. 4-13A). Die Inkubation mit 2 μ M und 10 μ M **GW9662** führte hingegen an allen Untersuchungstagen zur Erhöhung der Anzahl kontrahierender EBs (Abb. 4-13B). Bei der 10 μ M GW9662-Behandlung wurde am Tag 4+8 eine 50 %-ige, am Tag 4+10 eine 20 %-ige, am Tag 4+12 eine 60 %-ige und am Tag 4+14 eine 20 %-ige Erhöhung der Anzahl kontrahierender EBs erzielt.

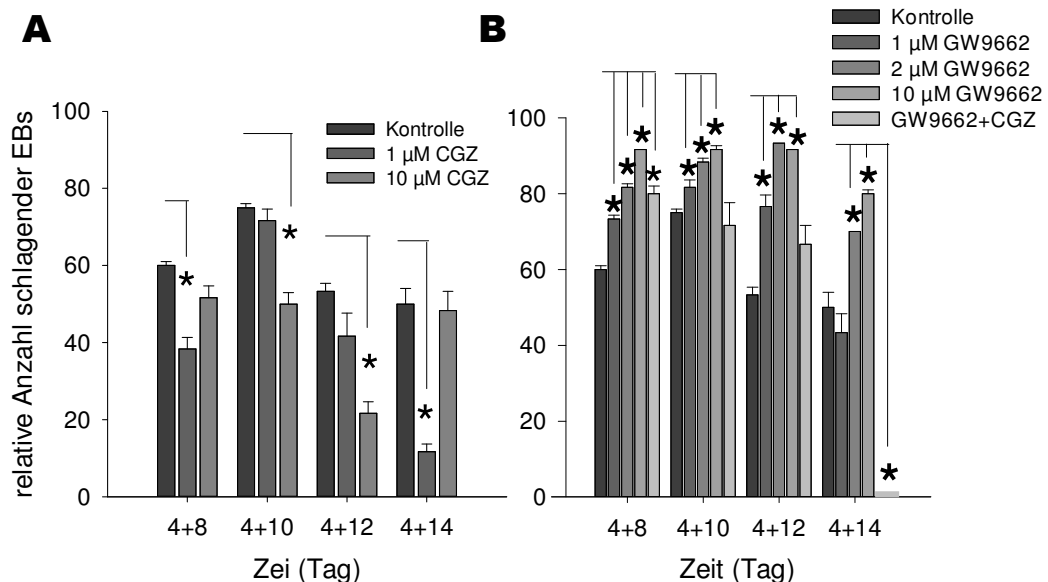


Abb. 4-13: Anzahl der kontrahierenden EBs nach Inkubation mit PPAR- γ -Agonisten

Bestimmung der Anzahl kontrahierender EBs nach Inkubation mit (A) **Ciglitazon** (1 μ M, 10 μ M) (B) **GW9662** (1 μ M, 2 μ M, 10 μ M) sowie die Koinkubation mit GW9662 (10 μ M) und CGZ (10 μ M). Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber der Kontrolle des jeweiligen Tages * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test.

Die **Kombination** von Agonist und Antagonist führte am Tag 4+14 mit 100 % zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl schlagender EBs im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4-13B).

Die Messung der Schlagfrequenz (*beats per minute* (bpm)) zeigte eine **CGZ**-abhängige Reduktion, was v. a. bei einer Konzentration von 1 μM und 10 μM CGZ an den Tagen 4+10 und 4+14 zu beobachten war. Besonders 10 μM CGZ führten an den Tagen 4+10 und 4+14 zu einer 50 %-igen, und damit signifikanten Verringerung der Schlagfrequenz (Abb. 4-14A). Die Inkubation mit **GW9662** führte generell zu einer Frequenzerhöhung der Kontraktionen im adhären EB (Abb. 4-14B). Dies war vor allem bei den niedrigen Konzentrationen von 1 μM und 2 μM GW9662, aber auch bei 10 μM , zu beobachten. Die **Kombination** von 10 μM CGZ mit GW9662 hatten am Tag 4+10 einen 50 %-igen, also signifikant erhöhenden Effekt auf die Kontraktionsfrequenz gegenüber der Kontrolle (Abb. 4-14B).

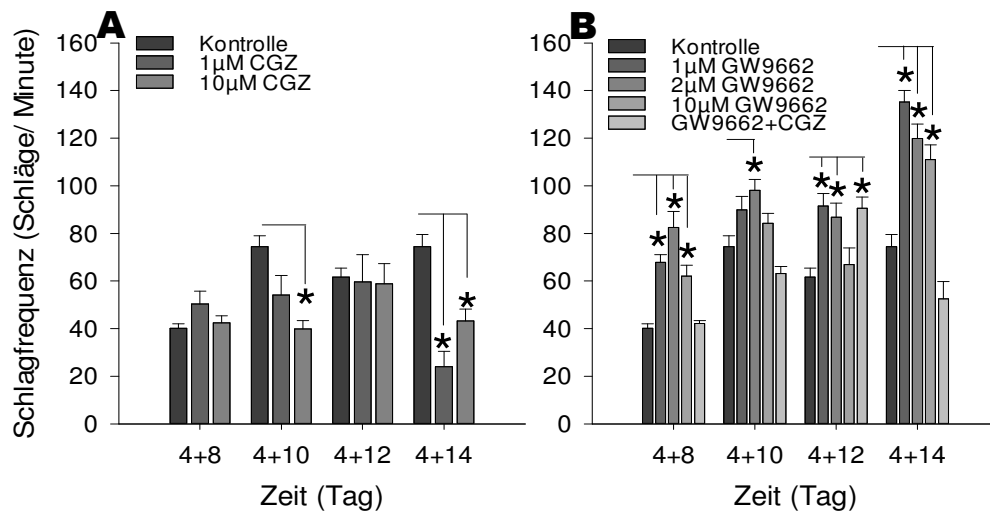


Abb. 4-14: Frequenz der Kontraktionen (Schläge/Minute, bpm) in den inkubierten EBs

Analyse der Frequenz der Kontraktionen von an Tag vier ausplattierten EBs nach Inkubation mit (A) **Ciglitazon** (1 μM , 10 μM), (B) **GW9662** (1 μM , 2 μM , 10 μM) und einer Kombination von GW9662 (10 μM) und CGZ (10 μM). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der jeweiligen Kontrolle * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

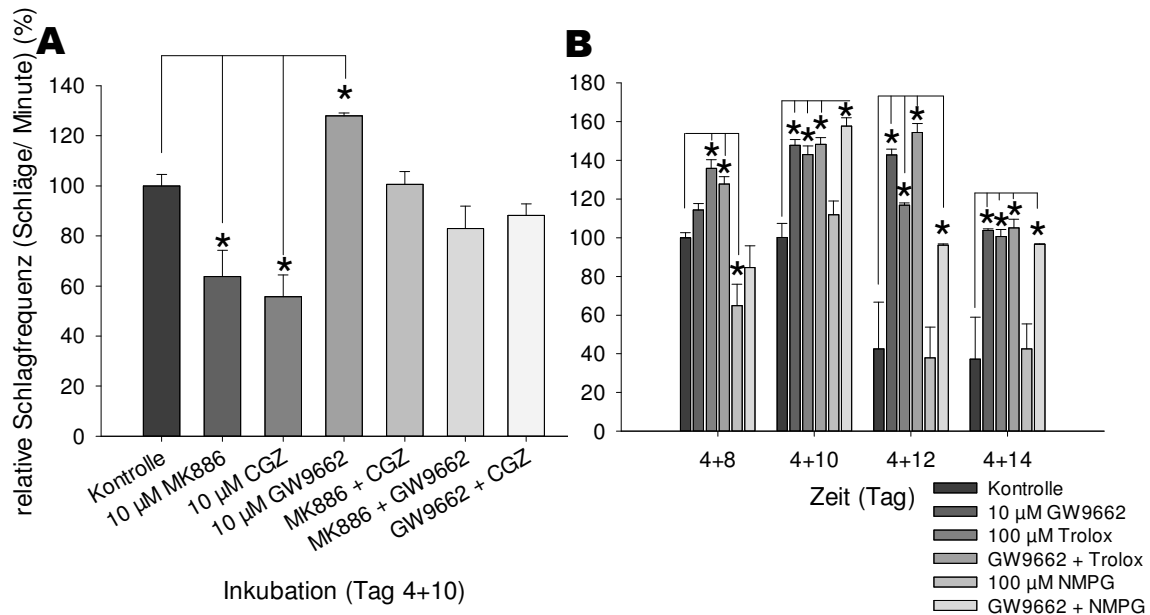


Abb. 4-15: Frequenz der Kontraktionen (Schläge/Minute, bpm) nach der Inkubation mit PPAR- α und PPAR- γ Liganden

(A) Analyse der Kontraktionen von an Tag vier ausplattierten EBs nach Inkubation mit 10 μ M MK886 (PPAR- α -Antagonist), 10 μ M CGZ, 10 μ M GW9662 und deren Kombination am Tag 4+10. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Untersuchung der Schläge/Minute (%) nach 4+10 Tagen Inkubation mit 10 μ M GW9662, 100 μ M Trolox und 100 μ M NMPG und deren Kombination. Signifikanz gegenüber Wert der jeweiligen Kontrolle * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Für die Untersuchung der weiteren Beteiligung an der Kardiomyogenese wurde der PPAR- α -Antagonist MK886 eingesetzt (Abb. 4-14, Abb. 4-15). Die Frequenz der Kontraktionen konnte durch die Zugabe des PPAR- α -Antagonisten MK886 am Tag 4+10 um 30 % signifikant reduziert werden (Abb. 4-15A).

Die Inkubation mit dem Radikalfänger Trolox (100 μ M) und dem PPAR- γ -Antagonisten GW9662 (10 μ M) sowie deren Kombination führten zur Erhöhung der Kontraktionen an den Tagen 4+10, 4+12 und 4+14 (Abb. 4-15B). Die Behandlung mit 100 μ M N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycin (NMPG), einem weiteren Radikalfänger, führte zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktionsfrequenz von Kardiomyozyten im EB am Tag 4+8 (Abb. 4-15B).

4.2.6.2 Produktion freier Sauerstoffradikale

Da die ROS als *"second messenger"* während der Differenzierungsprozesse, z. B. der Kardiomyogenese, wirken, wurde deren Generierung mittels DCF-Fluoreszenz am cLSM gemessen.

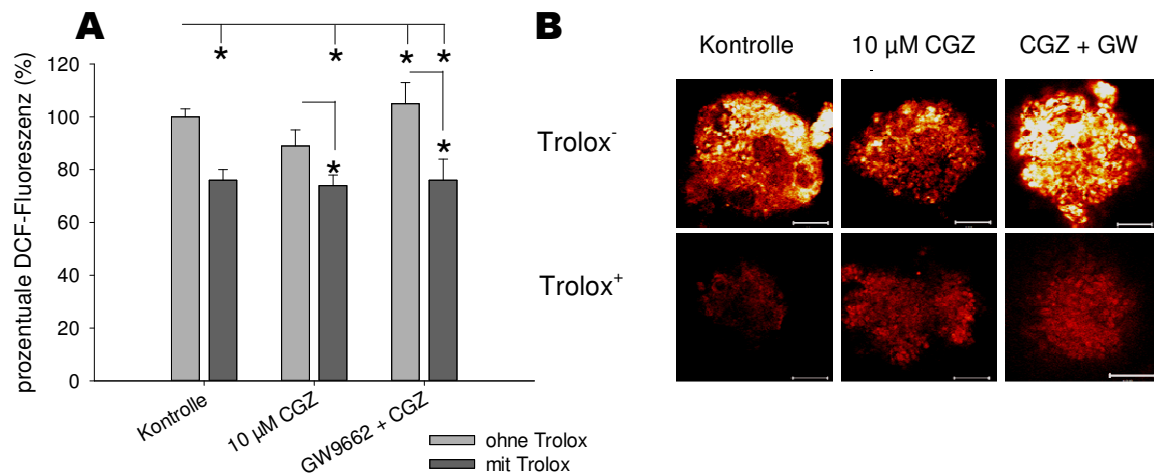


Abb. 4-16 A/B: ROS-Generierung nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden

(A) **Semiquantitative Auswertung der ROS-Fluoreszenz:** 48 h Inkubation von vier Tage alten EBs mit 10 μ M CGZ, 10 μ M GW9662 und Koinkubation mit Trolox zur Kontrolle. (B) **Fluoreszenz von DCF** mittels cLSM Zeiss 510[®] Meta, Farbgebung nach *Glow Scale-LSM Image Examiner*. Maßstab entspricht 100 μ m. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Die Behandlung mit 10 μ M **CGZ** erzeugte keine Veränderung der ROS-Generierung im Vergleich zu den Kontroll-EBs (Abb. 4-16B). Die zusätzliche Inkubation mit Trolox zu CGZ wies eine Herunterregulation des ROS-Signals um etwa 40 % auf (Abb. 4-16A).

Die Abb. 4-16C,D zeigt, dass die Inkubation mit 1 μ M, 2 μ M und 10 μ M **GW9662** eine signifikante Hochregulation der ROS-Produktion im Vergleich zur Kontrolle hatte. Die Zusatzbehandlung mit Trolox hob den durch GW9662-bedingten Effekt signifikant auf. Die **Kombination** von 10 μ M CGZ und 10 μ M GW9662 führte zur signifikanten Hochregulation des ROS-Signals.

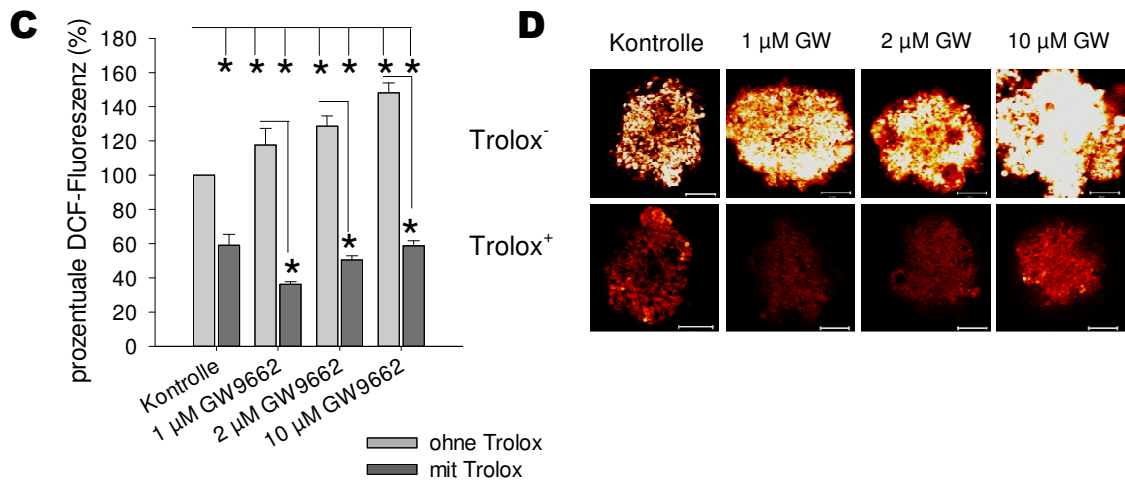


Abb. 4-16 C/D: ROS-Generierung nach Inkubation mit PPAR- γ Liganden

Semiquantitative Auswertung der ROS-Fluoreszenz: (C) Inkubation von vier Tage alten EBs mit 1 μ M, 2 μ M und 10 μ M GW9662 mit und ohne Trolox für 48 h, als Kontrolle dienten unbehandelte EBs. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der unbehandelten Kontrolle am Tag 4+2 * $p < 0,05$ Students-Newman-Keuls ANOVA Test. **(D) Fluoreszenz von DCF** mittels cLSM Zeiss 510[®] Meta, Farbgebung nach *Glow Scale-LSM Image Examiner*. Maßstab entspricht 100 μ m. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Das ROS-Signal wurde am Tag 4+2, 48 h nach der Zugabe des PPAR- α -Antagonisten MK886 im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant reduziert (Abb. 4-17A). Die Inkubation mit den PPAR- α -Antagonisten MK886 (10 μ M) und 100 μ M Trolox führte zur signifikanten Reduktion des ROS-Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4-17A).

Die Messung der ROS-Generierung im EB nach 48 h-Inkubation mit den Radikalfängern 100 μ M Trolox, 100 μ M NMPG und der Kombination mit dem PPAR- γ Antagonisten GW9662 (10 μ M) führte zur signifikanten Reduktion des ROS-Signals (Abb. 4-17B). Die Inkubation mit 10 mM H₂O₂ stellte die Positiv-Kontrolle für die DCF-Messung dar (Abb. 4-17B).

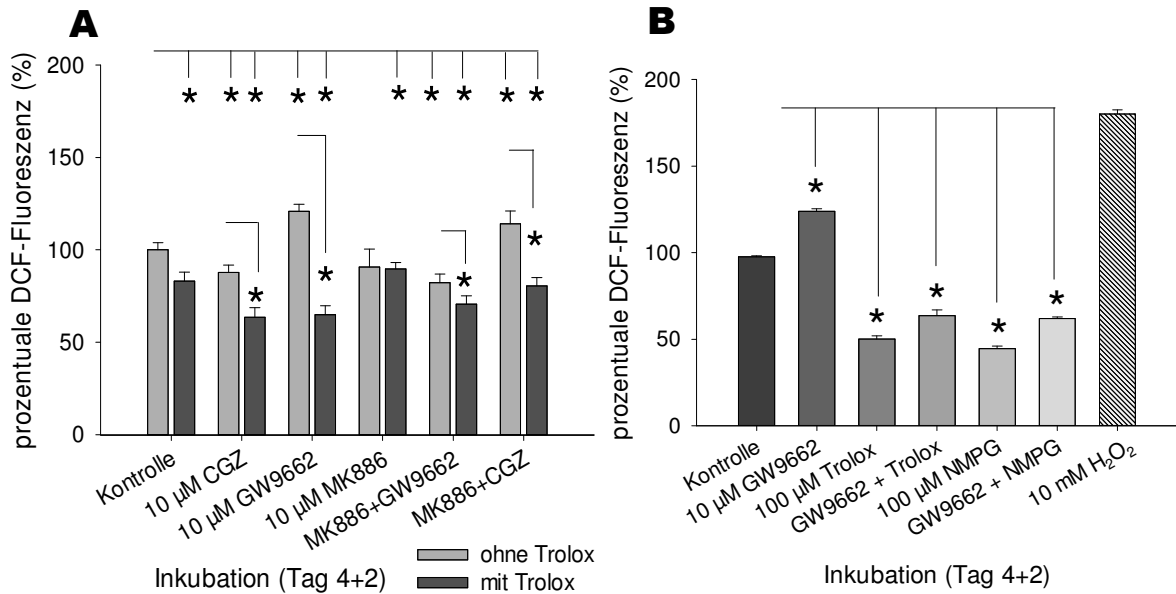


Abb. 4-17: ROS-Generierung nach PPAR- γ - und PPAR- α -Liganden

(A) **Semiquantitative Auswertung des ROS-Signals:** Vier Tage alten EBs wurden mit 10 μ M MK886, 10 μ M CGZ, 10 μ M GW9662 und (B) mit 100 μ M NMPG, 10 μ M GW9662 in den Varianten mit und ohne Trolox inkubiert, als Kontrolle dienten unbehandelte EBs. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der unbehandelten Kontrolle am Tag 4+2 * $p < 0,05$ Students-Newman-Keuls ANOVA-Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

4.2.6.3 Nachweis früher kardialer Gene

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung des PPAR- γ mit 10 μ M GW9662 die Kardiomyogenese, z. B. die Frequenz der Kontraktionen und die Anzahl kontrahierender EBs, erhöht wird. Ebenso sollte analysiert werden, ob PPAR- γ im Modellsystem EB in die Aktivierung der Transkription von frühen kardialen Genen involviert ist. Um die entsprechenden Testberichte zu verdeutlichen, wurde die Expression der folgenden frühen kardialen Transkriptionsfaktoren mittels quantitativer *real time RT-PCR* analysiert (Abb. 4-18 und Abb. 4-19): des "*LIM-homeobox transcription factor1*" (*isl1*), des proepikardialen Markergens *tbx5* (*T-box5 Gen*), des "*cardiogenic homeodomain factor*" (*nkx2.5*) und des Funktionsgens "*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 gene*" (*hcn4*).

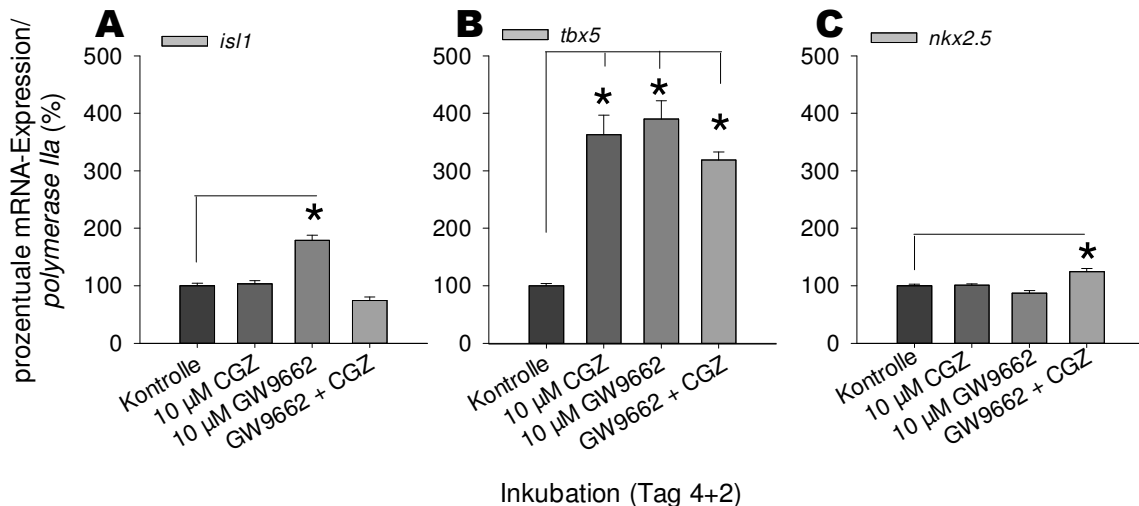


Abb. 4-18: Prozentuale mRNA-Expression der embryonalen kardialen Gene

Messung der prozentualen mRNA-Expression nach Inkubation mit dem PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten mittels quantitativer *real time RT-PCR* von adhärenenten EBs normalisiert gegen *polymerase IIa* als "house keeping"-Gen. (A) *isll*, (B) *tbx5* und (C) *nkx2.5*. Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolte Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der Kontrolle nach 48 h (Tag 4+2) Inkubationszeit (Tag 4+2) * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Die *isll*-mRNA-Expression am Tag 4+2 zeigte mit 10 μ M **CGZ** sowie der **Kombination** beider Substanzen keinen Unterschied zur Kontrolle. Dagegen wurde *isll* durch 10 μ M **GW9662** signifikant um das Doppelte zur Kontrolle hochreguliert (Abb. 4-18A). Der GW9662-Effekt konnte durch die Zugabe von CGZ inhibiert werden (Abb.4-18A). Die Behandlung von vier Tage alten adhärenenten murinen EBs zeigte nach 48 h Inkubation mit 10 μ M **CGZ** um das 3,7-fache, 10 μ M **GW9662** um das 3,9-fache und deren **Kombination** um das 3,3-fache eine signifikante Erhöhung des *tbx5*-Gens (Abb. 4-18B). Die Einzelinkubationen mit 10 μ M **CGZ** bzw. 10 μ M **GW9662** führten zu keiner Veränderung der *nkx2.5*-mRNA-Expression zur Kontrolle (Abb. 4-18C). *nkx2.5* wurde am Tag 4+2 nur durch die **Kombination** von 10 μ M CGZ und 10 μ M GW9662 signifikant zur Kontrolle hochreguliert.

Zur Untersuchung der Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die Differenzierung von Kardiomyozyten wurde der Marker α -Aktinin als Strukturprotein verwendet (Abb. 4-19).

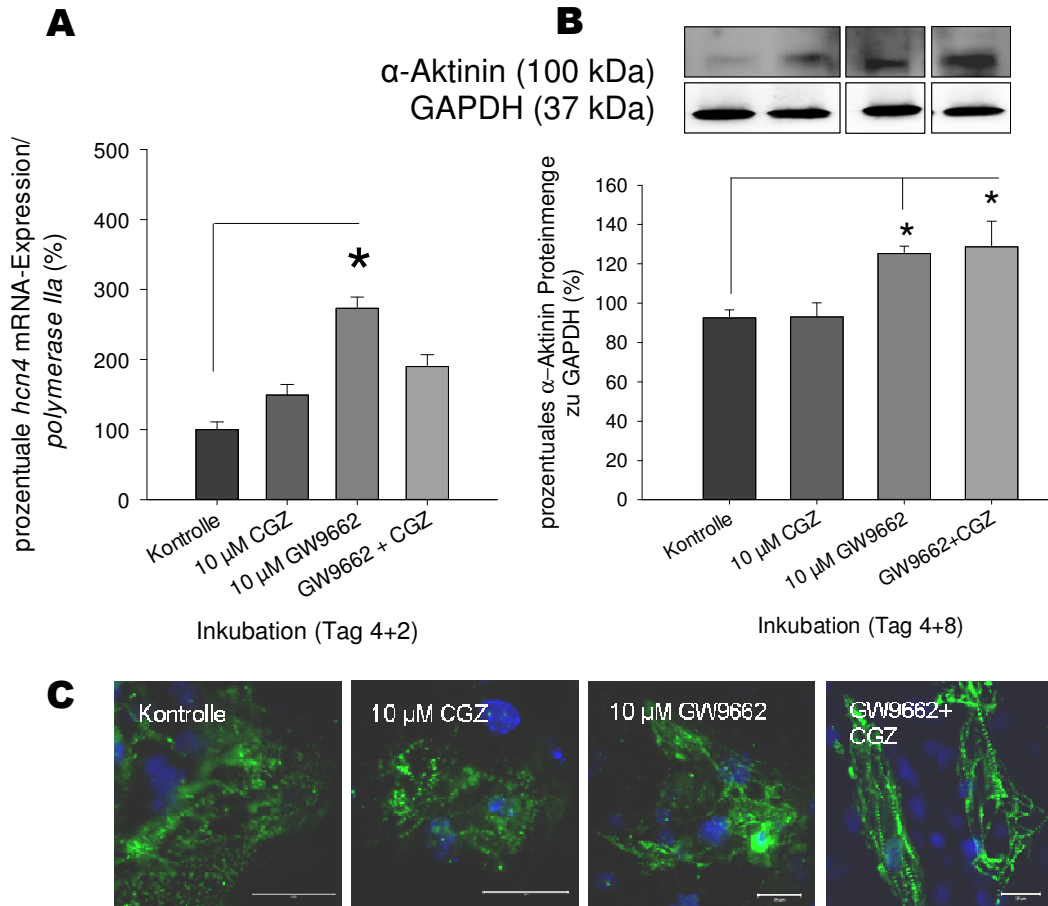


Abb. 4-19: Effekte der PPAR- γ -Liganden auf *hcn4* und α -Aktinin-Synthese

(A) Messung der prozentualen *hcn4*-mRNA-Expression nach Inkubation mit dem PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten mittels quantitativer *real time RT-PCR* von adhären EBs normalisiert gegen *polymerase IIa* als "house keeping"-Gen. Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolte Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der Kontrolle nach 4+8 Tagen Inkubationszeit * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. (B) **α -Aktinin-Proteinmenge** (100 kDa) zu **GAPDH** (37 kDa) nach Inkubation mit PPAR- γ -Agonist und -Antagonist. Dafür wurden 75 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolte Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der Kontrolle nach 4+8 Tagen Inkubationszeit * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. (C) **Immunfluoreszenz** von α -Aktinin (grün), Zellkerne (blau) sind mittels DAPI markiert. Maßstab entspricht 50 μ m. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Die *hcn4*-mRNA-Expression erhöhte sich nach Inkubation der EBs mit 10 μ M CGZ zwar um 50 %, übte aber keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aus. Wohingegen die Behandlung des EBs mit 10 μ M GW9662 *hcn4* um ca. das 2,5-fache hochregulierte (Abb.

4-19A). Die Untersuchung der *hcn4*-mRNA-Expression zeigte, dass die **Kombination** keinen signifikanten Effekt hervorruft.

Das α -Aktinin-Proteinlevel zeigte nach der Inkubation mit 10 μ M **CGZ** keinen Effekt zur DMSO-Kontrolle am Tag 4+8 (Abb. 4-19B). Andererseits konnte durch die Zugabe von 10 μ M **GW9662** das α -Aktinin-Proteinniveau um 44 % erhöht werden und durch die **Kombination** mit 10 μ M CGZ sogar um 55 %.

Zusammenfassend reduzierte **CGZ** die Anzahl kontrahierender EBs (Abb. 4-13), die Kontraktionsfrequenz (Abb. 4-14A), ROS (Abb. 4-16) und *tbx5* (Abb. 4-18B) signifikant. Andererseits führte **GW9662** generell zur Erhöhung der ROS-Generierung (Abb. 4-16C/D, Abb. 4-19A) und der kardialen Marker *isll*, *tbx5* (Abb. 4-18A,B), *hcn4* (Abb. 4-19A), α -Aktinin (Abb. 4-19B), der Kontraktionen/Minute und Anzahl schlagender EBs (Vergleich Abb. 4-13B, Abb. 4-14B).

4.2.7 Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die vaskuläre Differenzierung im EB

Zur Untersuchung des Einflusses der PPAR- γ -Liganden auf das vaskuläre System im *in vitro*-Modell EB wurden die Effekte auf CD31⁺-Strukturen, auf der glatten Muskulatur ("α-smooth muscle actin") mittels Immunfluoreszenz und die Stickstoffmonoxid (NO)-Generierung mit Immunfluoreszenz und Western Blot analysiert.

4.2.7.1 Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die endotheliale Differenzierung

Der Einfluss der PPAR- γ -Liganden auf die endotheliale Differenzierung wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz analysiert. Dadurch konnten auch strukturelle Veränderungen an CD31⁺-Strukturen nach Zugabe von PPAR- γ -Liganden visuell untersucht werden. Dafür wurden vier Tage alte EBs auf adhärenste PS ausplattiert und mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten für 8, 10, 12 und 14 Tage inkubiert.

Als Folge der Zugabe von 10 μ M **CGZ** waren die CD31⁺-Strukturen während der EB-Entwicklung an den Tagen 4+10, 4+12 und 4+14 reduziert (Abb. 4-20). Hingegen erhöhte 1 μ M CGZ die CD31⁺-fluoreszierende Flächen relativ zur Kontrolle an den Tag 4+8, 4+10 und 4+12 (Abb. 4-20A). Der PPAR- γ -Antagonist (2 μ M **GW9662**) induzierte eine Erhöhung der CD31⁺-fluoreszierende Fläche über die Zeit relativ zur Kontrolle an den Tag 4+12 (Abb. 4-20B). 1 μ M und 2 μ M GW9662 erhöhten leicht die CD31⁺-fluoreszierende

Fläche an den Tagen 4+8 und 4+10. Die **Kombination** aus PPAR- γ -Agonist und -Antagonist verursachten eine Reduktion der CD31⁺-Fläche (Abb. 4-20B).

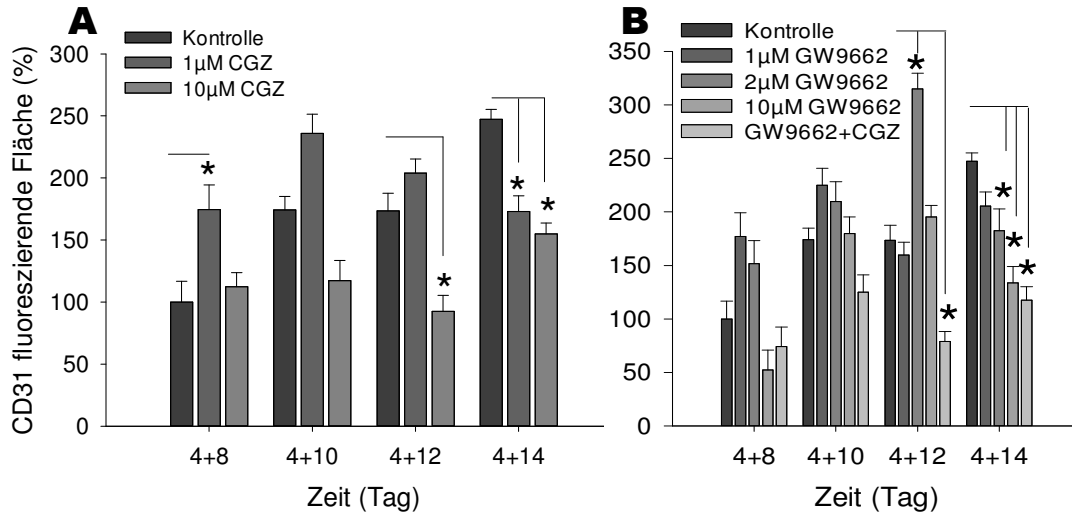


Abb. 4-20: Quantitative Auswertung der CD31⁺-Fläche

Für die Messung wurden adhärente vier Tage alte EBs ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen von (A) CGZ und (B) GW9662 sowie deren Kombination behandelt. Es wurde ein Zeitraum von 4+8 - 4+14 Tage gewählt. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test.

In Abb.4-21 sind repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz von CD31 zu sehen, wobei PPAR- γ Agonist und Antagonist (jeweils 10 μ M) sowie deren Kombination (10 μ M) gegenübergestellt sind. Es ist zu erkennen, dass die Gefäßmorphologie durch die Zugabe des Agonisten und Antagonisten zeitabhängig beeinträchtigt wurde. Die Proben, welche mit 10 μ M CGZ behandelt wurden, zeigten eine reduzierte CD31⁺-Struktur im Vergleich zur Kontrolle an den Tagen 4+8 - 4+14 (Abb. 4-14). Hingegen verursachte die 10 μ M GW9662-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle ein gut ausgebildetes CD31-Netzwerk am Tag 4+10, welches sich im Laufe der Kultivierungszeit verringerte. Die **Kombination** aus CGZ und GW9662 reduzierte die CD31⁺-Ausbildung.

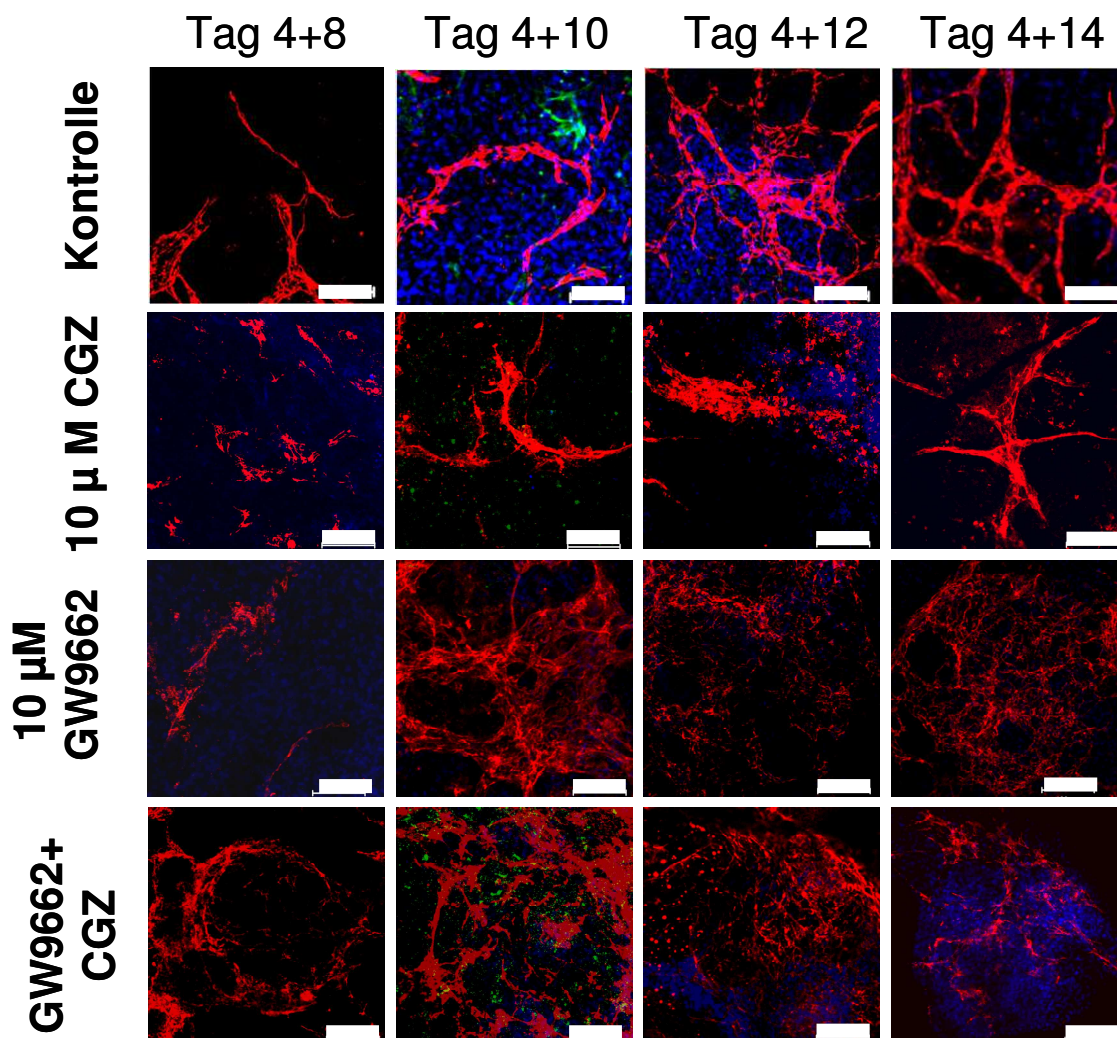


Abb. 4-21: Einfluss der PPAR- γ -Liganden auf die vaskuläre Differenzierung im EB

Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von EBs, welche mit 10 μ M CGZ und 10 μ M GW9662 sowie deren Kombination (10 μ M) unterschiedlich lange inkubiert wurden. Dargestellt sind CD31 (rot), der Zellkern (blau) und α -SMC (grün). Der Maßstab entspricht 100 μ m.

4.2.7.2 Generierung von Stickstoffmonoxid nach Behandlung mit PPAR- γ -Liganden

Für den Nachweis der endothelialen NOS (eNOS) wurden am Tag 4 ausplattierte EBs mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten sowie deren Kombination (10 μ M) für weitere acht Tage behandelt. Der Nachweis der eNOS erfolgte durch Detektion der nicht-phosphorylierten eNOS zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels Western Blot (eNOS/GAPDH) (Abb. 4-22C).

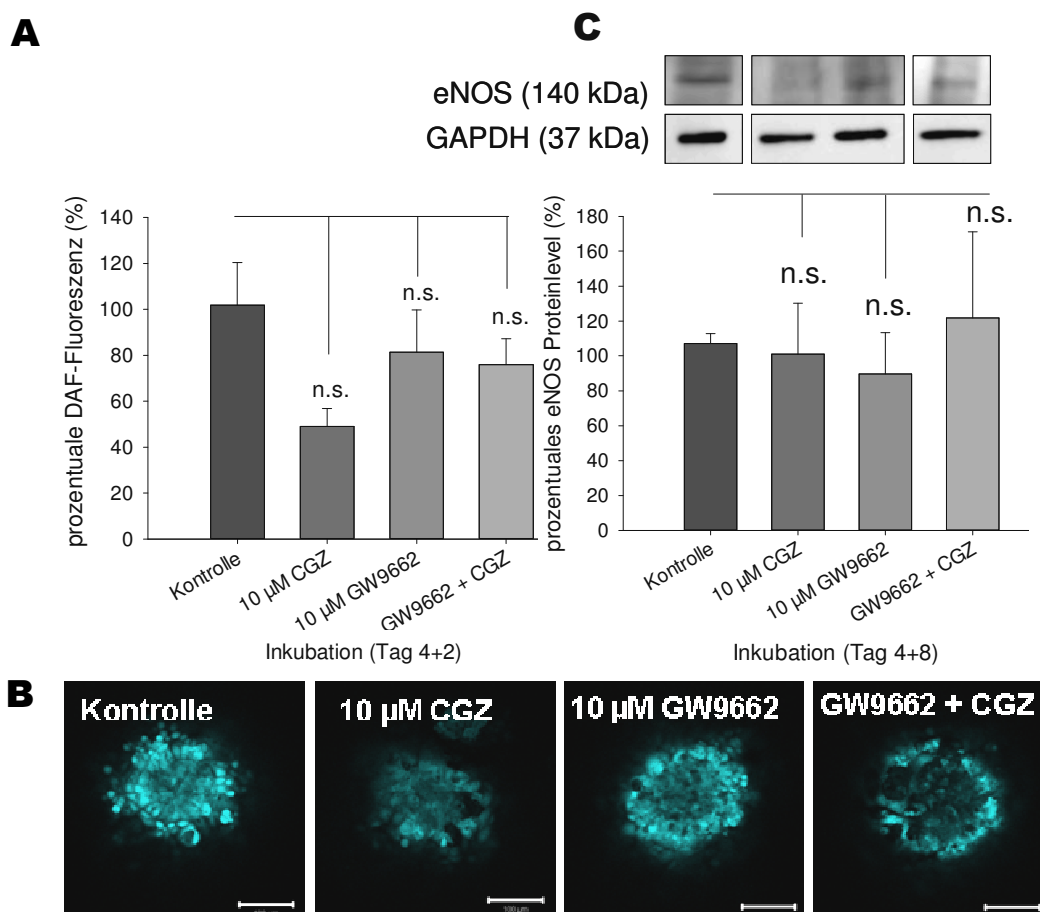


Abb. 4-22: NO-Bildung nach Behandlung mit PPAR- γ -Liganden

(A) **Semiquantitative Auswertung der DAF-Fluoreszenz**, welche mittels cLSM aufgenommen und die Fluoreszenzintensität analysiert wurde (%) nach Inkubation mit PPAR- γ -Agonisten 10 μ M Ciglitazon (CGZ) und Antagonisten (10 μ M GW9662) sowie deren Kombination am Tag 4+2. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. (B) **Fluoreszenz von DAF** (blau). Der Maßstab entspricht 100 μ m. (C) **Nachweis des unphosphorylierten eNOS-Proteinlevels** am Tag 4+8, normalisiert zu GAPDH. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Am Tag 4+2 untersuchten wir die Freisetzung von NO und am Tag 4+8 das Proteinlevel der eNOS, da das maximale Proteinlevel der eNOS im Zeitraum von Tag 8 – 12 liegt (Bartsch *et. al.*, 2011). Es wurden vier Tage alte EBs ausplattiert und diese am Tag 4+2 mittels DAF-FM-Diacetat auf die Freisetzung von NO am cLSM untersucht.

Die NO-Generierung (Abb. 4-22A) wurde nicht signifikant durch die Zugabe von 10 μ M **CGZ** oder 10 μ M **GW9662** und deren **Kombination** zur Kontrolle am Tag 4+2 beeinflusst. Dennoch war eine tendenzielle Reduktion, und zwar um 50 %, der DAF-Fluoreszenz im Vergleich zwischen 10 μ M **CGZ** und Kontrolle am Tag 4+2 detektierbar (Abb. 4-22A). Demgegenüber konnten keine Unterschiede hinsichtlich des eNOS-Proteinlevels im Vergleich zu den behandelten EBs zur Kontrolle gezeigt werden (Abb. 4-22C). Eine Freisetzung der NO war nicht detektierbar, da eine phosphorylierte Form der eNOS nicht detektiert werden konnte.

4.2.7.3 Einfluss von Alkohol auf die *PPAR*-Expression und Endothelzellen im EB

Die PPARs sind neben ihrem hier untersuchten Einfluss auf Embryogenese auch in den zellulären Fett- und Energiestoffwechsel involviert. In unserer Arbeitsgruppe (cand. med. Stephanie Leissner) konnte die Generierung von Leberzellen aus embryonalen Stammzellen im *in vitro*-Modell EB gezeigt werden (Chinzei *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass die *PPAR- γ* mRNA-Expression durch die Behandlung mit Alkohol bei adipösen Mäusen hochreguliert wird (Everitt *et al.*, 2013). *PPAR- γ* kommt in hohen Mengen im Fettgewebe vor und nimmt eine Schlüsselrolle während der Differenzierung zu Fettzellen ein (Desvergne *et al.*, 2006). Zudem besteht ein enger Zusammenhang zum Alkoholkonsum, dem Diabetes mellitus Typ II sowie dem metabolischen Syndrom, welches mit koronaren Herzerkrankung und Insulinresistenz einhergeht.

Die Inkubation mit Ethanol erfolgte bis Tag 4+8, an welchem die Messung durchgeführt wurde. Die Behandlung von 4+8 Tage alten EBs führte zum signifikanten Anstieg der *PPAR- α* -mRNA-Expression bei 1,7 mmol/l und 17 mmol/l Ethanol. Wie die mRNA-Expression von *PPAR- β/δ* und *- γ* zeigte, führte die 17 mmol/l Ethanolinkubation zum tendenziellen Anstieg der mRNA-Expression (Abb. 4-23). Aus den genannten Gründen wurde der Effekt von Ethanol auf die Differenzierung endothelialer Strukturen im *in vitro*-Modell EB untersucht.

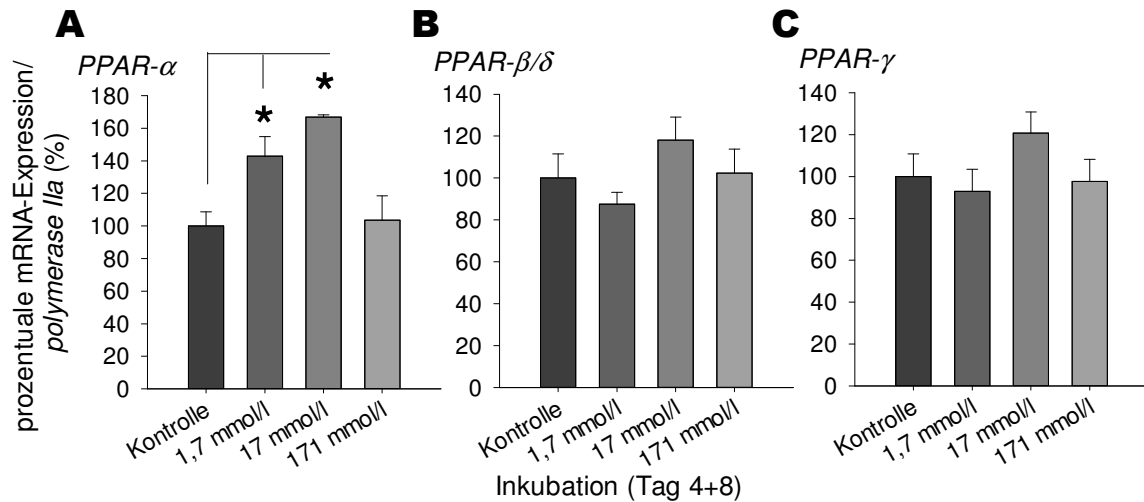


Abb. 4-23: Prozentuale mRNA-Expression der *PPARs* nach Ethanolbehandlung

Messung der relativen mRNA-Expression gegen *polymerase IIa* als „house keeping“-Gen mittels Agarosegel-PCR von adhären EBs am Tag 4+8. (A) Expression von ***PPAR-α***, (B) von ***PPAR-β/δ***, (C) ***PPAR-γ***. Dargestellt sind Mittelwert \pm gepoolter Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der Kontrolle am Tag 4+8 * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test.

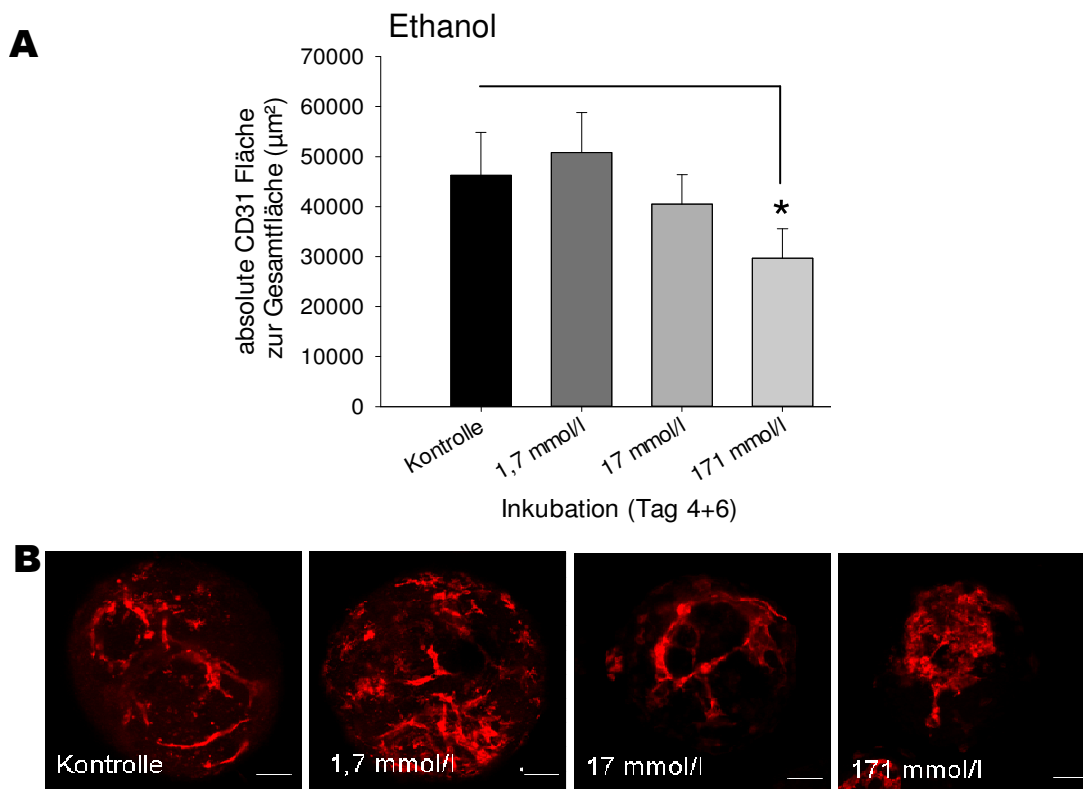


Abb. 4-24: Ethanoleffekte auf die Differenzierung von Endothelzellen

(A) **Absolute CD31⁺-Strukturen** nach Ethanolbehandlung. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der Kontrolle Tag 4+6 * $p < 0,05$ % mittels ANOVA. (B) **Immunfluoreszenz von CD31⁺-Strukturen** (rot) mittels cLSM Zeiss 510® Meta (20x-Objektiv) am Tag 4+6 nach Ethanolinkubation. Der Maßbalken entspricht 100 μm.

Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Ethanolkonzentration von 171 mmol/l am Tag 4+6 eine signifikante Reduktion der CD31⁺-Fläche zur Folge hatte (Abb. 4-24). Die 17 mmol/l und 1,7 mmol/l-Konzentrationen hatten keinen Effekt auf die Ausbildung von Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4-24).

4.2.7.4 Effekt der PPAR- γ -Liganden auf die Differenzierung der glatten Muskulatur im EB

Zur Analyse der Differenzierung der glatten Muskulatur wurden vier Tage alte EBs auf adhären PS ausplattiert und für 8, 10, 12 und 14 Tage inkubiert.

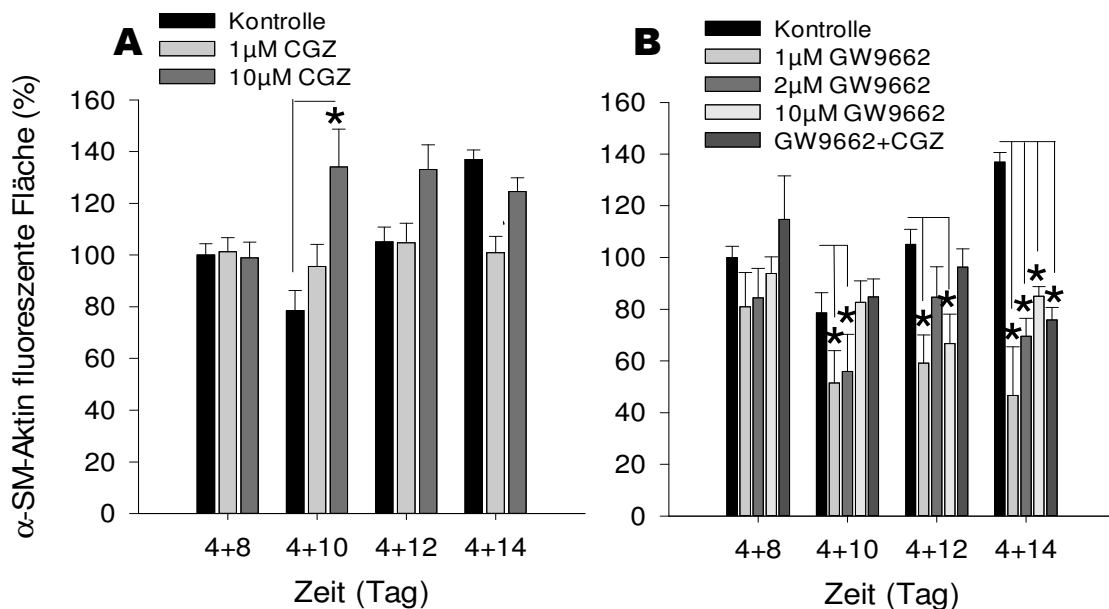


Abb. 4-25: Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die Ausbildung der glatten Muskulatur

Dargestellt ist die α -SMA⁺-fluoreszente Fläche. Dafür wurden vier Tage alte EBs ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen von (A) CGZ und (B) GW9662 sowie in Kombination mit Agonist und Antagonist behandelt. Hierfür wurde ein Zeitraum von 4+8 - 4+14 Tagen gewählt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Wert der Kontrolle des jeweiligen Tages * $p < 0,05$ mittels One-way-ANOVA-Test. Als Kontrolle dienten mit DMSO (1:1000 Verdünnung im Medium) inkubierte EBs.

Die Differenzierung der glatten Muskulatur wurde nach Zugabe von 10 μ M CGZ an den Tagen 4+10 und 4+12 stimuliert und erhöhte so die α -SMA⁺-Fläche. Die Inkubation mit 1 μ M CGZ hatte an den Tagen 4+8, 4+10 und 4+12 keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen (Abb.4-25A). Die Behandlung mit GW9662 führte ab Tag 4+10 zu einer signifikanten Reduktion der α -SMA⁺-Fläche um 40 % zur Kontrolle (Abb. 4-25B). Die α -SMA⁺-Fläche war am Tag 4+8 durch die Zugabe von CGZ und GW9662 sowie deren Kombinationen (10 μ M) im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die Kombination aus

PPAR- γ -Agonisten und dem -Antagonisten führte am späten Inkubationstag (Tag 4+14) zur signifikanten Abnahme der α -SMA⁺-Fläche (Abb. 4-25B).

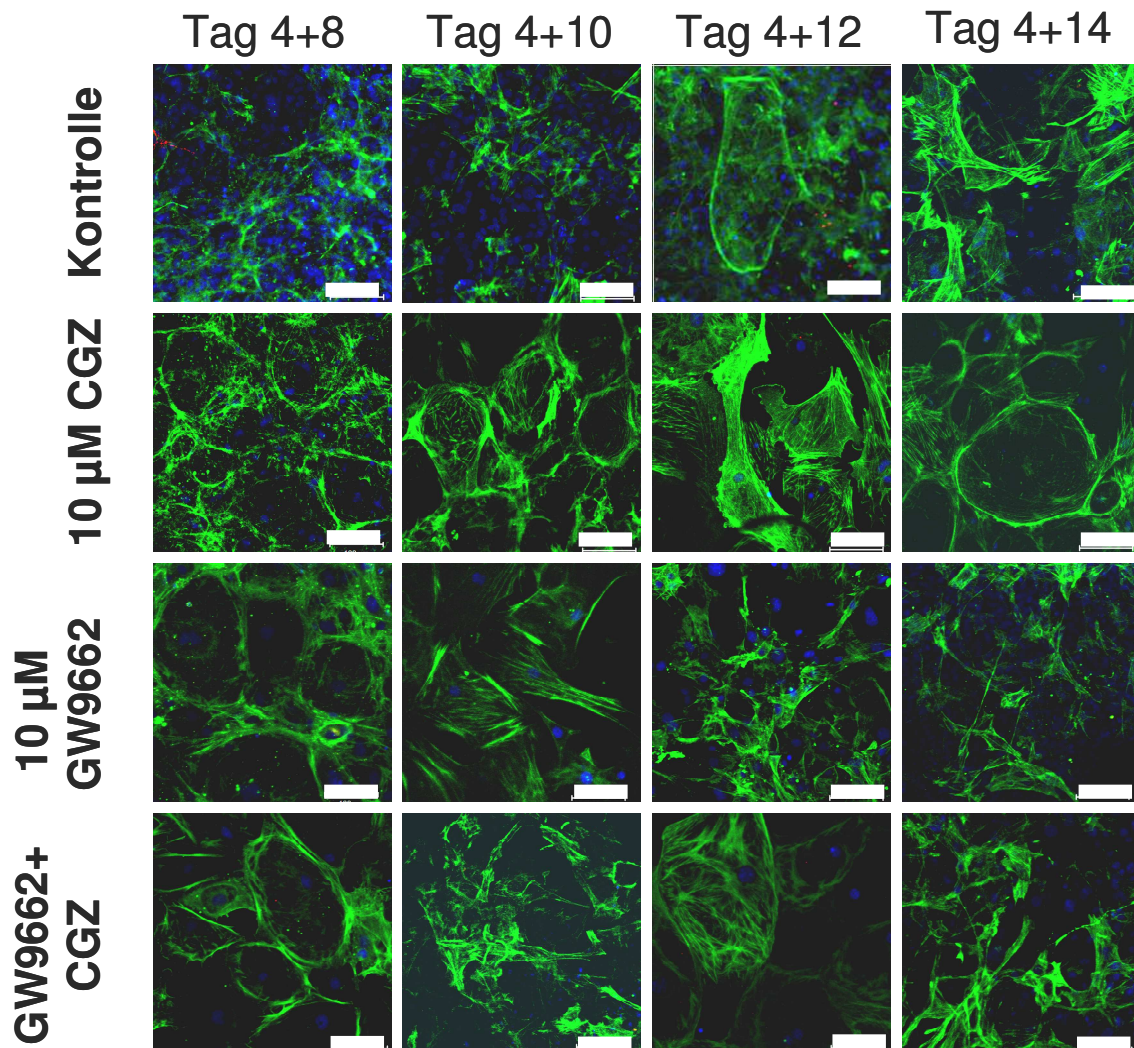


Abb. 4-26: Repräsentative α -SMA⁺-Immunfluoreszenz

Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von EBs, welche mit 10 μ M CGZ und 10 μ M GW9662 sowie deren Kombination (10 μ M) unterschiedlich lang inkubiert wurden. Dargestellt sind Zellkern (blau) und α -smooth muscle actin (α -SMA) (grün). Der Maßstab entspricht 100 μ m.

Die α -SMA⁺-fluoreszierende Fläche zeigt, dass sich durch die Zugabe von 10 μ M **CGZ** im Vergleich zur Kontrolle eine sehr gut ausgebildete Struktur differenziert (Abb. 4-26). Die Behandlung mit 10 μ M **GW9662** und der **Kombination** aus den PPAR- γ -Liganden zeigt ein α -SMA-filamentöses Netzwerk, welches sich durch die Abnahme der Ausbreitung und Anzahl der Filamente unterscheidet.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein gewebespezifischer Effekt der PPAR- γ -Liganden auf die Vaskulogenese zu beobachten war. Hierbei führte **CGZ** zu einer

Reduktion der CD31⁺-Strukturen sowie zu einer tendenziellen Abnahme der detektierten DAF-Fluoreszenz. Es konnte aber eine verbesserte α -SMA-Ausbildung durch CGZ gezeigt werden. Andererseits führte der PPAR- γ -Antagonist **GW9662** zu einem besseren CD31⁺-Netzwerk im Vergleich zu CGZ. Jedoch beeinflusste GW9662 die eNOS-Synthese und DAF-Fluoreszenz nicht. Des Weiteren konnte eine Reduktion der α -SMA-fluoreszierenden Fläche beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der "embryoid bodies"

Bevor wir die Effekte der PPAR- γ -Liganden im Bezug auf die Kardiovaskulogenese untersuchen konnten, musste eine initiale Charakterisierung des verwendeten Stammzellmodells vorgenommen werden. Hierbei ist bereits bekannt, dass die Differenzierung von Flk1⁺-kardiovaskulären Progenitorzellen aus Brachyury⁺ (Bry⁺)-mesodermalen Vorläufern erfolgt. Danach werden in der frühen Phase der Embryogenese aus mesodermalen Flk1⁺-Hämangioblasten kardiovaskuläre Gewebe gebildet (Jezierski *et al.*, 2007). Die darauf aufbauende Genese verschiedener Organ- bzw. Blutversorgungssysteme setzt an den Folgetagen ein (Iida *et al.*, 2005). Ziel unserer Versuchsreihe war es nun, diese Zeitfenster an der verwendeten CGR8-mES-Zelllinie zu determinieren. Zuerst wiesen wir Hämangioblasten anhand ihres Markerproteins Flk1 im EB nach. Unsere ersten Untersuchungsergebnisse belegten, dass Flk1 in mES-Zellen zu Beginn der embryonalen Entwicklung am Tag 3 – Tag 5 und Tag 7 maximal synthetisiert wurde. Andere Veröffentlichungen zeigten einen ähnlichen Flk1-Verlauf in mES-Zellen mit Maxima an den Tagen 3 und 6 (Vittet *et al.*, 1996, Bartsch *et al.*, 2011). Die Differenzierung zu endothelialen Zellen ist, wie eingangs beschrieben, nur aus den Flk1⁺-Blastenkolonien in der EB-Kultur möglich (Faloon *et al.*, 2000). So dokumentierten z. B. *knock out*-Studien, dass in murinen *flk1*^{-/-}-Embryonen die Entwicklung von endothelialen und hämatopoetischen Zellen ausgeblieben waren (Shalaby *et al.*, 1997). Die Bildung von Flk1⁺-Progenitorzellen ist deshalb essentiell für eine Differenzierung zu kardiovaskulären Zelltypen. Wir konnten mittels Immunfluoreszenz und *SDS-PAGE* das maximale Niveau des CD31-Proteins an den Tagen 5 - 8 und - ein zweiter Anstieg - am Tag 18 nachweisen (Abb. 5-1). Die CD31⁺-Strukturen entwickelten sich im Laufe der CGR8-Kultivierung von einzelnen positiven Zellen zu *Clustern*, die sich zu einem tubulären Netzwerk formierten und einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung im EB dienten (Wartenberg *et al.*, 1998). Im Embryo können sich erste endotheliale Zellen im äußeren Bereich des viszeralen Dottersacks am Tag E7.0-7.5, parallel mit den ersten Blutinseln differenzieren. Somit stimmen die dargestellten Prozesse der endothelialen Differenzierung *in vivo* und *in vitro* überein (Buckingham *et al.*, 2005). Unsere Untersuchungen zeigten weiterhin, dass sowohl die mesodermale (Flk1⁺) als auch die endotheliale (CD31⁺)-Differenzierung in einem biphasischen Muster verlaufen. Dieses zeitlich voneinander versetzte Auftreten von Flk1⁺- und CD31⁺-Zellen würde für eine Flk1-

abhängige Differenzierung der endothelialen Strukturen sprechen, da CD31 der Flk1-Entstehung folgt und Flk1 die Differenzierung von Endothelzellen aus mesodermalen Vorläuferzellen beeinflusst, was der aktuellen wissenschaftlichen Hypothese entspricht (Kattman *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2008, Hannig *et al.*, 2010).

Um die Differenzierung von vaskulären Strukturen zu komplettieren, wurde die glatte Muskulatur mit dem "alpha smooth muscle"-AK detektiert. Die vorliegende Arbeit zeigte mittels Immunfluoreszenz und SDS-PAGE den Beginn der Differenzierung zur glatten Muskulatur am Tag 6 in der adhärennten mES-Zellkultur (Abb. 5-1). Die strukturelle Bildung der glatten Muskulatur konnte am Auftreten der α -SMA⁺-Zellen gezeigt werden, welche sich während der Kultivierung zu einem filamentösen Netzwerk ausgebildet hatten. Diese Ergebnisse korrelieren mit Clément *et al.* (2007), wobei die α -SMC⁺-Lokalisation vor allem in der EB-Außenschicht am Tag 6 auftreten.

Da sich die vorliegende Arbeit mit den Effekten der PPAR- γ -Liganden auf die kardiovaskuläre Differenzierung auseinandersetzt, wurde im Anschluss der zeitlichen Charakterisierung der kardiovaskulären Zellen die PPAR-Genexpression untersucht. Es konnte mittels quantitativer RT-PCR gezeigt werden, dass die drei PPAR-Isotypen unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Die Maxima der PPAR- α lagen am Tag 12, PPAR- β/δ am Tag 6 und PPAR- γ an den Tagen 6 -8 und Tag 18. Im verwendeten EB-Modell konnte die PPAR- α -Genexpression zeitgleich mit dem Auftreten der glatten Muskulatur gezeigt werden (Abb.5.1), was für die PPAR- α -Lokalisation in den glatten Muskelzellen spricht (Staels *et al.*, 1998). Unsere Beobachtungen in der CGR8-Zelllinie zeigten ein zeitgleiches Auftreten der PPAR- γ mit der Differenzierung von CD31⁺-Strukturen. Anhand dieser Daten konnten wir einen ersten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von PPAR- γ und der Lokalisation in Endothelzellen (Sato *et al.*, 1999) sowie in der vaskulären glatten Muskulatur herstellen (Law *et al.*, 2000). Wir konnten auch zeigen, dass PPAR- β/δ in höheren Mengen als die PPAR- α und - γ exprimiert werden, womit wir die Ergebnisse von Desvergne und Wahli (1999) bestätigten. Zudem stellten wir auch eine gemeinsame Expression von PPAR- β/δ und CD31⁺ fest, was für deren Interaktion sprechen könnte. Die Studie von Sharifpanah *et al.* (2008) postulierte, dass die drei Subtypen der PPARs in der CCE ES-Zelllinie unterschiedliche Expressionsmuster haben, was mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten CGR8 ES-Zelllinie auch bestätigt wurde.

Zusammenfassend konnten wir schlussfolgern, dass sich der EB als *in vitro*-Modell aufgrund der dargestellten Expressionsmuster für die Kardiovaskulogenese-Untersuchung als geradezu ideal empfiehlt. Die Ergebnisse unserer Studie bieten somit eine als Vorarbeit für weitere sh-RNA-Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen der Kolokalisation von PPARs und der kardiovaskulären Differenzierung sein. Das Modell birgt darüber hinaus umfangreiches Untersuchungspotential zur Erforschung der Interaktionen zwischen den PPAR-Isotypen und der Embryogenese an.

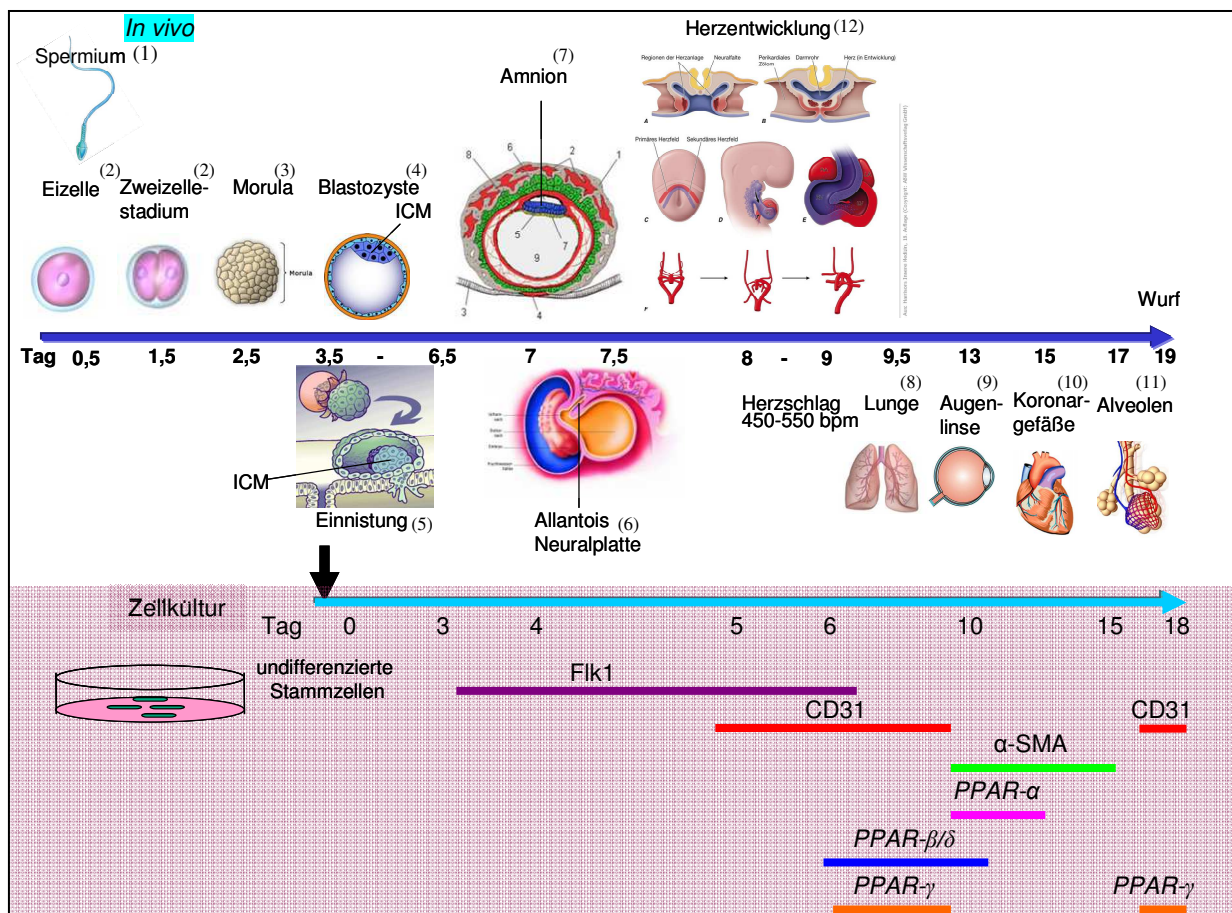


Abb. 5-1: Embryonale Entwicklung der Maus

In vivo-Entwicklung der Maus ab der Fertilisation (Tag E0) bis zum Wurf (Tag E16 -19) (Theiler, 1989) und darunter die Gegenüberstellung der differenzierten Strukturen *in vitro* in der verwendeten mES-Zelllinien, welche die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerspiegeln (violett unterlegt). (modifiziert ^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12})

5.2 Wirkung der PPAR-γ-Liganden auf mES-Zellen

Im Anschluss an die Charakterisierung der mES-Zellen wurde die toxische Wirkung der verwendeten Substanzkonzentrationen von CGZ und GW9662 auf die genutzte Zelllinie untersucht. Während der Kultivierung galt es, eine apoptotische Wirkung der Arbeitskonzentrationen zu vermeiden, um eine physiologische Dosis in der Arbeit zu

gewährleisten. Es wurden zum einen die EthD-2-Messung und zum anderen das Verhältnis von *cleaved* Caspase3 zur Caspase3 ermittelt. Die Ergebnisse der EthD-2-Messung ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen von CGZ und GW9662 zur Kontrolle. Um diese Ergebnisse zu stützen, wurde das Verhältnis zwischen *cleaved* Caspase3 zur Caspase 3 auf Proteinebene untersucht, was ebenfalls zu keiner apoptotischen Wirkung führte. Da keine Beeinflussung der Caspase3 bestand, hätte dies mit einer Positivkontrolle bzw. mit alternativen Apoptose-Assays untermauert werden können, z.B. mittels 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-, Annexin V und Propidium Iodide (PI)-Test in der Sub-G₁-Phase oder Nachweis der Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), um eine noch eindeutigere Schlussfolgerung zu erzielen.

Schlussendlich konnten wir keine Erhöhung der Zellmortalität bei den 10 µM-Konzentrationen von Agonist und Antagonist nachweisen, weshalb wir diese Konzentrationen in allen weiteren Experimenten verwendeten. Damit liegen die von uns verwendeten Konzentrationen auch im Arbeitsbereich anderer Forschergruppen, wie z. B. an ESCs (10 µM GW9662, Sharifpanah *et al.*, 2008), an Brustkrebszelllinien (IC₅₀ von 20 -30 µM GW9662, Seargent *et al.*, 2004), an der Leberkarzinomzelllinie HepG2 (LD₅₀ 125 µM GW9662; LD₅₀ 76 µM CGZ, Henderson und Cheatham, 2006 und IC₅₀ 20 µM CGZ, Palakurthi *et al.*, 2001) oder an VSMCs (10 µM CGZ, Jozkowicz *et al.*, 2000) demonstriert werden konnte.

Die Untersuchung des Spaltschlussverhaltens von mES-Einzelzellschicht nach der Inkubation mit dem PPAR-γ Agonisten CGZ zeigte einen tendenziell beschleunigten Spaltschluss im *Scratch-Assay* (Straatman *et al.*, 2008), was auf eine erhöhte Migration nach CGZ-Stimulation schließen lässt. Unsere Ergebnisse stützen sich dabei auf die gesamte Zellpopulation im EB, und wir können daher keine genauen Aussagen über die einzelnen Zelltypen treffen, welche nach CGZ Behandlung migrierten. Zur weiteren Untersuchung der gewanderten Zellarten müsste die Gesamtpopulation der EB-Zellen nach verschiedenen mesodermalen Subtypen separiert und analysiert werden. Die im Zentrum unserer Arbeit stehenden kardiovaskulären Zellen scheinen einen geringeren Anteil der migrierten Zellpopulation auszumachen, denn Marx *et al.* (1998) und Law *et al.* (2000) dokumentierten, dass durch die Zugabe von TZD eine Reduktion der Migration von HUVECs zu beobachten war. Einen maßgeblichen Beitrag an der Migration haben wahrscheinlich neuronale Zellen, weil Morales-Garcia *et al.* (2011) an Neurosphäroiden eine erhöhte Migrationsrate nach der Behandlung mit PPAR-γ Agonisten feststellten.

Weiterhin wurden das Proliferationsverhalten der mES-CGR8-Zelllinie mittels *ki67*-mRNA und der Zyklus-Arrest-Marker p27^{Kip1} in Abhängigkeit von CGZ untersucht. Wir konnten dokumentieren, dass die *ki67*-mRNA-Expression nach Zugabe von CGZ im EB signifikant erhöht ist. Gleichzeitig war das p27^{Kip1}-Proteinniveau durch die Behandlung mit CGZ signifikant hochreguliert. Die *ki67*-Ergebnisse induzieren eine beschleunigte Mitoseaktivität (Gerdes *et al.*, 1984), wohingegen der signifikante Anstieg des p27^{Kip1}-Proteinlevels den Verbleib der ES-Zellen in der G₁/S- Phase suggeriert (Chen und Harrison, 2005). Denn p27^{Kip1} bindet an Zyklin D/E und an deren katalytischen Untereinheiten CDK4/2 (zyklinabhängige Kinase 4/2) und inhibiert somit die Aktivität des zyklinabhängigen Kinaserezeptors (Millard *et al.*, 1997; Chen und Harrison, 2005). Daher bewirkt ein Anstieg von p27^{Kip1} den Verbleib der Zelle in der G₁-Phase, was mit einer Reduktion der Proliferation und des Zellwachstums einhergeht (Millard *et al.*, 1997). Allerdings konnten Untersuchungen zeigen, dass der Einfluss von CGZ auf den Zellzyklus unabhängig vom regulären Signalweg und den "peroxisome proliferator response element" (PPRE) geschieht, sondern seine Wirkung über die Blockade der Proteasomen-Aktivität entfaltet (Chen und Harrison, 2005). Dieser Mechanismus könnte auch im EB durch CGZ aktiviert werden.

Eine Erklärung für das Paradoxon des Verbleibs in der G₁-Phase bei gleichzeitiger Proliferation liegt darin, dass die EB-Kultur eine Vielzahl unterschiedlichster Zellpopulationen ausbildet. Dabei proliferieren bestimmte Zelltypen nach Inkubation mit CGZ und erhöhen die Expression von *ki67*, wohingegen andere ein erhöhtes p27^{Kip1}-Proteinniveau zeigen. In der Literatur finden sich korrespondierende Ergebnisse, denn CGZ hemmt die Zellteilung von murinen Leukämiezellen (Lea *et al.*, 2004) und Brustkrebszellen (Seargent *et al.*, 2004), aber TZD beschleunigt die Proliferation von mES-Zellen (Peymani *et al.*, 2013). Als Lösungsvorschlag und Ansatz für weitere Forschungen sehen wir wiederum eine Zellseparation nach kardiovaskulären Subpopulationen (z.B. Flk1⁺, α -SMA⁺ und CD31⁺) als erfolgversprechend an. Denkbar sind auch eine zeitabhängige Regulation der ES-Proliferation nach CGZ Zugabe und ein verstärkter Einfluss durch LIF (Peymani *et al.*, 2013), was in weiterführenden Untersuchungen erforscht werden könnte.

In der GW9662-Stimulation der mES-Zellen konnten ähnliche Ergebnisse wie für die Behandlung mit CGZ in Bezug auf die *ki67*-mRNA-Expression und das p27^{Kip1}-Proteinlevel beobachtet werden (Abb. 5-2). Als Lösungsansatz für die geschilderte Differenz zwischen hochregulierten Proliferations-(Gerdes *et al.*, 1984) und Zellzyklus-Arrest-Markern (Chen und Harrison, 2005) dienen wiederum die unterschiedlichen Zelltypen des EBs. Die

Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass durch GW9662 andere Zelltypen reguliert wurden als durch CGZ, da auch eine Stimulation der Zellzahl und der EB-Größe durch GW9662 zu beobachten war (Abb. 5-2). Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigen die zelllinienabhängige Wirkung der PPAR- γ -Antagonisten auf die Proliferationsrate (Seimandi *et al.*, 2005, David *et al.*, 2007). So konnten unter anderem unterschiedliche Effekte gezeigt werden, welche auf die Dosisabhängigkeit bzw. die Bindung der Liganden an die PPAR- α und - β/δ zurückzuführen sind (Seimandi *et al.*, 2005).

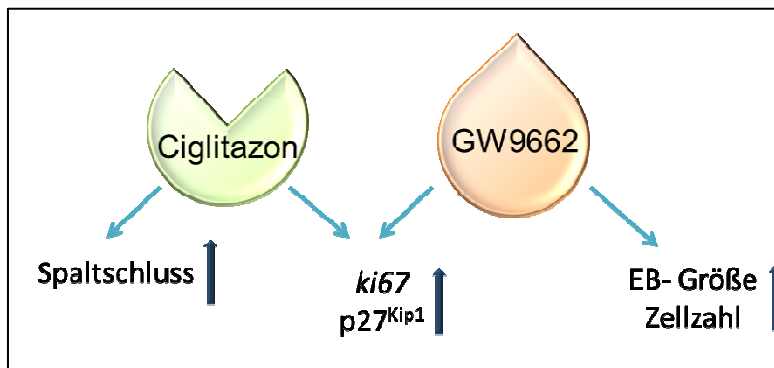


Abb. 5-2: Zusammenfassung der Ergebnisse von Ciglitazon und GW9662 auf die Proliferation und Migration, welche während der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Damit liefert unsere Arbeit sehr interessante Datensätze, die als Ausgangspunkt für die scheinbar komplexen PPAR- γ -abhängigen Proliferationsregulationen im EB dienen könnten. Wie schon erwähnt, müsste für weitere Untersuchungen eine zeit- und technikaufwendige Zell-

isolation aus der Gesamtpopulation des EBs erfolgen. Selbstverständlich könnten zur Erforschung der vaskulären Genese auch existente Zelllinien wie HUVECs oder VSMCs genutzt werden.

Effekte der PPAR- γ -Liganden auf die PPAR-Expression im EB-Modell

Die PPAR-Agonisten und -Antagonisten können sowohl PPAR- α , - β/δ sowie - γ und damit die Zellentwicklung auf verschiedene Weise beeinflussen (Leesnitzer *et al.*, 2002). Darum untersuchten wir die Interaktion zwischen den getesteten Liganden und allen PPAR-Isoformen. Die Inkubation mit dem PPAR- γ -Antagonisten GW9662 reguliert die PPAR- α -mRNA-Expression signifikant hoch. Frühere Publikationen zeigten korrespondierende Ergebnisse, die wahrscheinlich auf der Hemmung des PPAR- α -mRNA-Abbaus nach Blockierung mit GW9662 beruht (Leesnitzer *et al.*, 2002). Interessanterweise wurden die stimulierenden Wirkungen von GW9662 durch Zugabe von CGZ aufgehoben, denn die alleinige Behandlung mit CGZ regulierte die PPAR- α -Expression herunter, was für eine Aktivierung des PPAR- α und seinen darauffolgenden Abbau spricht. Weiterhin wirkten sich CGZ und GW9662 positiv auf die Expression von PPAR- β/δ aus, was Berger *et al.* (1996) schon für TDZ und Leesnitzer *et al.* (2002) für GW9662 dokumentierten. Nichtsdestotrotz

bedarf es weiterer Forschungen im Bereich der zellulären Wirkungsmechanismen, v. a. auf die Interaktion zwischen GW9662/CGZ und PPAR- β/δ .

Der Kern dieser Untersuchungsreihe bestätigte indes erwartungsgemäß (Vamecq und Draye; 1989), dass *PPAR- γ* durch GW9662 hoch- und von CGZ herunterreguliert wird. Ebenso konnte durch die Inkubation mit CGZ und GW9662 der GW9662-Effekt aufgehoben werden, wie es auch bei der *PPAR- α* -mRNA-Expression zu beobachten war. Als Erklärung für die Effekte von GW9662 auf PPAR- γ ist die Fähigkeit des Antagonisten zur spezifischen konfokalen Modifikation an Cys²⁸⁵ der PPAR- γ -Ligandenbindende Domäne zu nennen (Leesnitzer *et al.*, 2002). Die resultierende Inhibition des Liganden führt zu einer Inaktivierung der PPAR- γ -Proteine, wodurch die vorgeschaltete mRNA-Expression von *PPAR- γ* hochreguliert wird (Seargent *et al.*, 2004). CGZ hingegen wirkt aktivierend auf PPAR- γ und scheint dessen Abbauprozess zu stören, woraus eine Blockade der dazugehörigen mRNA-Transkripte erfolgt. Der exakte Effekt von CGZ auf sein *Target* PPAR- γ ist bislang nicht erforscht und benötigt fortführende strukturelle und biochemische Analysen. Trotzdem zeigen unsere Daten, dass CGZ in der Lage ist, den Einfluss von GW9662 auf die *PPAR- γ* (und - α)-mRNA-Expression zu eliminieren. Dieses suggeriert eine dominante Rolle von CGZ, welche den Effekt der GW9662-abhängigen Cys²⁸⁵-Modifikation der PPAR- γ -LBD umgeht, ausschaltet oder inhibiert (Leesnitzer *et al.*, 2002). Das hier beschriebene Modell der Kombinationsstimulation könnte daher als geeignetes Modell zu weiteren Proteinstrukturanalysen wie z. B. durch Kristallographie der LBD mittels 3D-Strukturanalyseprogramm GRID/CPCA (Kastenholz *et al.*, 2000) oder NMR-Spektrometrie sein. Zusammenfassend schlussfolgern wir, dass GW9662 und CGZ nicht nur mit *PPAR- γ* , sondern auch mit *PPAR- α* und *PPAR- β/δ* interagieren (Berger *et al.* 1996), wie z. B. von Leesnitzer *et al.* (2002) durch "scintillation proximity assay" (SPA) schon beschrieben wurde. Des Weiteren lassen unsere Ergebnisse auf eine starke Interaktion zwischen den einzelnen PPARs schließen, was auch in früheren Arbeiten schon postuliert wurde (Leesnitzer *et al.*, 2002). Um diesen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen PPARs und deren spezifischen Bindungsverhalten für Substanzen weiter zu untersuchen, sollten verschiedene Versuchsaufbauten mit Kombinationen aus PPAR- α -, - β/δ -, - γ -shRNA *Knock out*-Zelllinien und den verwendeten Substanzen designt werden.

Wirkung der PPAR- γ -Liganden auf die Differenzierung von Kardiomyozyten im EB-Modell

Die kardiovaskuläre Differenzierung nach der Zugabe von PPAR- γ -Liganden steht im Zentrum dieser Arbeit. Wie einleitend beschrieben, setzt die murine embryonale Herzentwicklung mit der Formation des Herzschlauchs am Tag E7.5 ein. Da sowohl unsere als auch die Studie von Clément *et al.*, (2007) in der mES-Kultur einen ähnlichen Verlauf zeigten, untersuchten wir die kardialen Marker und physiologischen Parameter nach dem Tag 4+2 *in vitro* (Bartsch *et al.* 2011). Festzustellen ist, dass unsere Ergebnisse keinen Einfluss von CGZ auf die kardiale Differenzierung nachweisen, denn die vorliegenden Datensätze dokumentieren einen Abfall der Schlagfrequenz, Anzahl kontrahierender EBs, der ROS-Generierung und

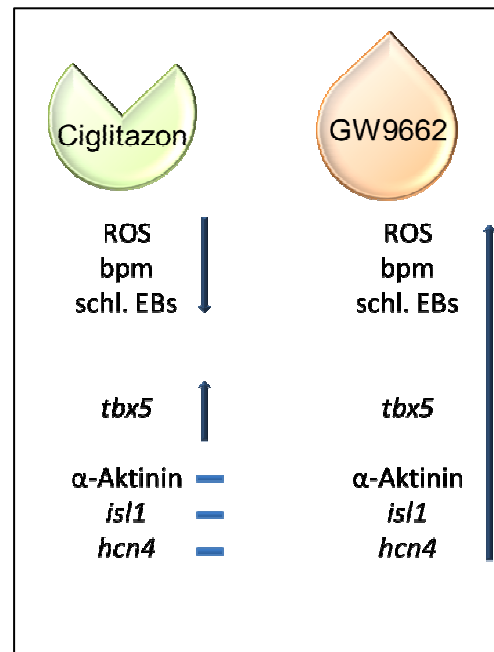


Abb. 5-3: Übersicht der Ergebnisse nach Inkubation mit PPAR- γ -Liganden auf die kardiale Differenzierung in mES-Zellen

des untersuchten Markerproteins (Abb. 5-3). Die Inkubation mit dem PPAR- γ -Antagonisten GW9662 bestätigte diese Daten, da GW9662 die Kardiomyogenese in folgenden Punkten stimuliert: Steigerung der Frequenz der Kontraktionen, der Anzahl kontrahierender EBs, des α -Aktinin-Proteinlevels, der Expression von *hcn4*, den Transkriptionsfaktoren *isl1*, *tbx5* sowie der Generierung von ROS (Abb. 5-3). Zur argumentativen Annäherung an die sehr komplexe Thematik der molekularen Herzentwicklung beginnen wir mit der Ergebnisdiskussion der ROS-Generierung, da diese als Signalmoleküle während der Kardiomyogenese wirken (Sharifpanah *et al.*, 2008). Wie gezeigt und bereits erörtert, reduziert die CGZ-Stimulation im EB die Bildung von ROS, was durch die Erhöhung der antioxidativen Katalase begründet sein könnte (Chen *et al.*, 2012). Andererseits induziert der untersuchte PPAR- γ -Antagonist die ROS-Generierung, was auf einen agonistischen Effekt von GW9662 auf PPAR- α zurückzuführen ist (Leesnitzer *et al.*, 2002) (Abb. 5-4). Damit bewirkt GW9662 eine Inaktivierung der PPAR- γ und aktiviert wahrscheinlich die ROS-Bildung *via* PPAR- α . Deshalb untersuchten wir die ROS-Generierung nach Zugabe des PPAR- α -Antagonisten MK886, was, wie erwartet, zu einer Herunterregulation des ROS-Signals führte. In diesem Zusammenhang dokumentierten wir, dass mittels Zugabe des PPAR- α -Antagonisten

(MK886) die durch GW9662-vermittelten kardialen Differenzierungsmechanismen in Bezug auf die Schlagfrequenz aufgehoben wurden. Somit korrespondieren unsere Resultate mit anderen Forschungsarbeiten, in denen eine gesteigerte ROS-Generierung nach Zugabe eines PPAR- α -Agonisten und die damit einhergehende Differenzierung der Kardiomyozyten durch ROS-abhängige Aktivierung der NADPH-Oxidase (Nox) gefunden wurde (Sharifpanah *et al.*, 2008). Um eine genaue Aussage über die ROS-Quelle zu treffen, müssten spezifische ROS-Inhibitoren verwendet werden, wie z.B. Diphenyliodonium (DPI) und Apozynin zur allgemeinen Blockierung der Nox oder wie Phenylarsinoxid (PAO) (Hamilton *et al.*, 2002) für die Inhibierung der Nox2, 2-Azetylphenothiazin (ML171, APT) (Berndt, 2013) oder 1,3-Benzoxazol-2-yl-3-benzyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-yl-Sulfid (VAS2870) (Lange *et al.*, 2009) für die Nox1-Inhibierung. Anhand ähnlicher Versuchsanordnungen erstellten Buggisch *et al.* (2007) und auch Bartsch *et al.* (2011) eine Zeitreihe für die zellmembranständigen Nox im EB. Sie postulierten eine zeitabhängige Expression der verschiedenen Nox während der EB-Entwicklung. Hierbei waren *Nox-1* an den Tagen 5 -10, *Nox-2* an den Tagen 10 -15 und die *Nox-4* an den Tagen 10 -18 vorhanden. Entscheidend für die kardiomyogenetische ROS-Bildung scheint aber Nox4 zu sein, denn ein "gene-silencing" mit siRNA inhibierte die kardiale Entwicklung im mES-Modell komplett (Li *et al.*, 2006). Zum Ausschluss einer Beteiligung des mitochondrialen Elektronentransport-Komplexes I dient eine Inkubation mit Rotenon. Dieser Versuchsaufbau von Sharifpanah *et al.* (2008) zeigte aber keinen Effekt auf die ROS-Bildung im EB, und somit ist die mitochondriale Atmungskette wohl nicht an diesem Prozess beteiligt. Unsere Untersuchungen bestätigten die bisherigen Forschungsergebnisse durch die Nutzung des Radikalfängers N-(2-mercapto-propionyl)-Glycin (NMPG), welcher die Effekte von GW9662 in der Kombinationsstimulation aufgehoben hatte. Damit postulierten wir eine spezifische Beteiligung der Nox-Familie und/oder der mitochondrialen Atmungskette an der GW9662-induzierten ROS-Bildung im EB (Bartsch *et al.*, 2011). Den von der ROS-Generierung-abhängigen Differenzierungsprozess kardialer Zellen, welcher von Sharifpanah *et al.* (2008) beschrieben wurde, konnten wir mit Hilfe von NMPG in unseren Experimenten bestätigen (Abb. 5-4), denn die Kombinationsbehandlung von GW9662 und NMPG verringerte die Schlagfrequenz und somit die Entwicklungsfähigkeit der Zellen zu funktionellen Kardiomyozyten.

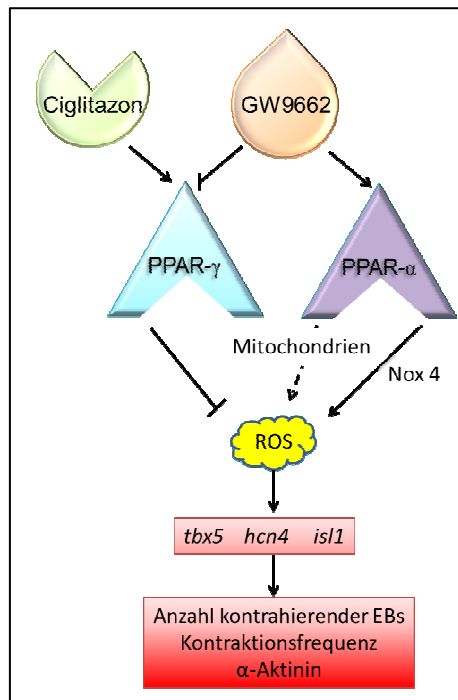


Abb. 5-4: Zusammenhang zwischen den PPARs und der kardialen Differenzierung

Auf der Grundlage der dargestellten Zusammenhänge zwischen der GW9662-induzierten ROS-Generierung und der kardialen Entwicklung lassen sich nun die genetischen Expressionsmuster erklären. Denn Sharifpanah *et al.* (2008) demonstrierten die Interaktion zwischen einer gesteigerten PPAR-abhängigen ROS-Generierung und der Expression kardialer Gene (Abb. 5-4). So konnte der PPAR-γ-Antagonist die frühen kardialen Marker *is11*, *tbx5* und *hcn4* via ROS hochregulieren. Hierbei ist bekannt, dass Tbx5 und Nkx2.5 miteinander interagieren (Xu *et al.*, 2009) und für die frühe Herzentwicklung entscheidend sind (Basson *et al.*, 1997, Li *et al.*, 1997, Kasahara *et al.*, 1998). Interessanterweise ist

die Regulation des phylogenetisch hochkonservierten Transkriptionsfaktors Tbx5 wohl PPAR-γ-unabhängig, da die Zugabe des PPAR-γ-Antagonisten GW9662 und des Agonisten CGZ zu einer erhöhten mRNA-Expression führten (Abb. 5-3). Parallel dazu konnten keinerlei Unterschiede zwischen Inkubation mit CGZ und GW9662 bezüglich der Expression des Homeoboxprotein Nkx2.5 gefunden werden, was durch dessen Interaktion mit Tbx5 begründet ist (Basson *et al.*, 1997, Kasahara *et al.*, 1998). Andererseits ist das LIM-Homeoboxprotein Is11 nur in den durch GW9662-stimulierten EBs hochreguliert, wodurch es zu einer verstärkten kardialen Differenzierung kommt. Denn dieses Protein ist ein Marker für Progenitorzellen des sekundären Herzfeldes (Cai *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2008), aus denen sich in der weiteren Entwicklung Kardiomyozyten bilden können. Darum konnte die Behandlung mit dem PPAR-γ-Antagonisten auch eine Hochregulation von α-Aktinin induzieren, welches als spezifisch für differenzierte Herzmuskelzellen gilt. Des Weiteren regulierte GW9662 die Expression von *hcn4*, einem spezifischen Kanal der Schrittmacherzellen, hoch (Kleger *et al.*, 2010), was mit den gemessenen physiologischen Parametern der Kontraktionsfrequenz und der erhöhten Anzahl an sich kontrahierender EBs einhergeht.

Daraus schlussfolgern wir, dass PPAR-γ nicht in die Kardiomyogenese involviert ist und seine Aktivierung die zellulären Prozesse der Herzentwicklung inhibiert. Nichtsdestotrotz spielen die PPARs eine entscheidende Rolle im Transkriptionsfaktor-Netzwerk der

Kardiomyozytenbildung, denn diese Zellen exprimieren die PPARs, deren Korezeptoren RXRs sowie *down stream-targets* in sehr hohen Raten (Honda *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2009). Hieraus schlossen wir auf eine essentielle Beteiligung von PPAR- α innerhalb dieses Differenzierungsmechanismus, wie es von unserer Kollegin Sharifpanah *et al.*, (2008) bereits beschrieben wurde (Abb. 5-4).

Wirkung der PPAR- γ -Liganden auf die vaskuläre Differenzierung im EB-Modell

Die murine Angiogenese beginnt im Rahmen der embryonalen Entwicklung am Tag 3.25. Unser *in vitro*-System zeigte hingegen die ersten CD31⁺-Zellen am Tag 4 zeigte (Abb. 5-1), weshalb wir die Versuche zur vaskulären Differenzierung nach dem Tag 4 vollzogen. Die Vaskulogenese setzt sich aus sehr komplex regulierten, endothelialen und muskulären Differenzierungsmechanismen zusammen (Risau *et al.*, 1988, Risau und Flamme, 1995, Iida *et al.*, 2005). Deshalb untersuchten wir den Einfluss des PPAR- γ -Antagonisten auf die Entwicklung des Endothels. Wir zeigten im Ergebnisteil, dass GW9662 die Bildung von CD31⁺-Strukturen aktiviert, wohingegen CGZ diese inhibiert (Abb. 5-5). Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibierung von PPAR- γ die Genese und die

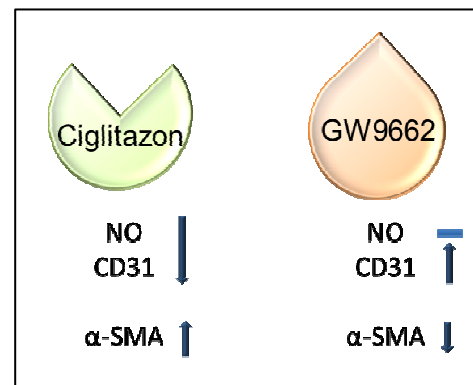


Abb. 5-5: Ergebniszusammenfassung der verwendeten PPAR- γ -Liganden auf die endotheliale Differenzierung, vor allem NO-Generierung, CD31 und α -SMA

Strukturierung der endothelialen Zellen fördert und im Umkehrschluss PPAR- γ einen antagonistischen Einfluss auf die Angiogenese hat (Risau und Flamme, 1995, Halama, 1999) (Abb. 5-6). Die Differenzierung der endothelialen Zellen wird v. a. durch die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert (Bryan *et al.*, 2009), weswegen wir dessen Bildung in Abhängigkeit der Stimulantien untersuchten (Abb. 5-6). Eine Aktivierung von PPAR- γ führte dazu, dass das zentrale Enzym der endothelialen NO-Produktion (eNOS) herunterreguliert wurde (Tontonoz *et al.*, 1998). Darauf aufbauend, inhibierte CGZ die NO-Synthese und damit einhergehend die Strukturbildung des Endothels, was vorherige Studien ebenfalls dokumentiert hatten (Yang *et al.*, 2013) (Abb. 5-6). Des Weiteren konnten Calnek *et al.*, (2003) und Schiffrin *et al.* (2005) unsere Daten untermauern, indem sie an humanen Endothelzellen die Reduktion von eNOS nach PPAR- γ -Aktivierung zeigten. Damit lassen sich auch die positiven Effekte der GW9662-Behandlung auf die Vaskulogenese erklären

(Tian *et al.*, 2009). Denn der PPAR- γ -Antagonist erhöhte eNOS-unabhängig die NO-Rate, was durch die gleichzeitige extreme Hochregulation der ROS aber wahrscheinlich maskiert wird (Xiao *et al.*, 2013). Um dieses detaillierter zu eruieren, könnte die NO-Synthese in Kombination mit "radical scavenger", wie z. B. Trolox, analysiert werden.

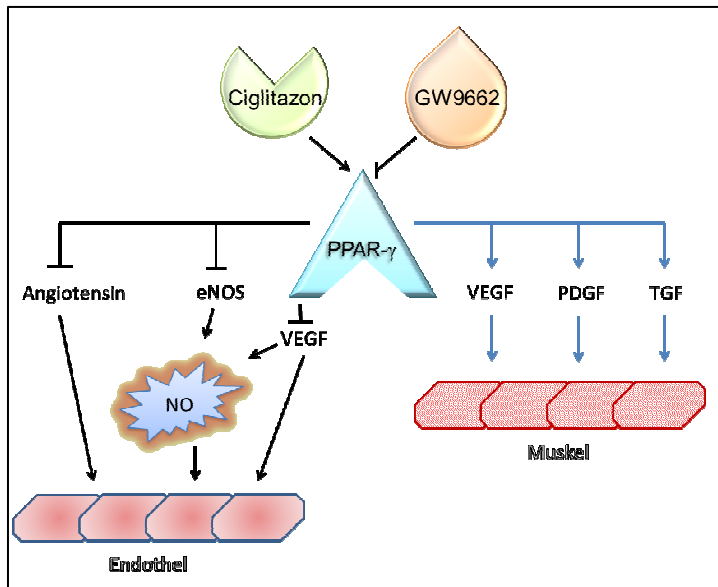


Abb. 5-6: PPAR- γ -Liganden-Zusammenhang auf die Aktivierung und Inhibierung auf die Muskulatur und Endothel

Des Weiteren sind in den angiogenetischen Prozess verschiedene Wachstumsfaktoren involviert, welche ebenso der PPAR-Regulation unterliegen oder zumindest von den PPARs beeinflusst werden. VEGF bildet ein Schlüsselmolekül des vaskulogenetischen Signalnetzwerkes und ist reziprok mit NO über HIF-1 reguliert (Kimura und Esumi, 2003). Die gezeigten Ergebnisse der Aktivierung von PPAR- γ in Bezug auf NO können

demnach zu einer Herunterregulation von VEGF führen und somit die geschilderte Inhibition der Endothelentwicklung erklären. Frühere Studien zeigten außerdem auch, dass der anti-angiogene Effekt der PPAR- γ -Agonisten wahrscheinlich über den Akt-Pathway (Goetze *et al.*, 2002) die Phosphorylierung von VEGF-Rezeptoren und inhibiert somit die Bildung und Proliferation von Endothelzellen unterdrückt (Xin *et al.*, 1999). Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor für die Vaskulogenese ist Angiotensin (Roks *et al.*, 2011), welches ebenfalls der Regulation durch PPAR- γ -Agonisten zu unterliegen scheint (Abb. 5-6). Hierbei steht zur Diskussion, dass die angiotensinogenen und angiotensin-umwandelnden Enzyme, z. B. "angiotensin converting encyme" (ACE), durch PPAR- γ unterdrückt werden können und somit wiederum die Endothelbildung stören (Ren *et al.*, 2011). Diese Effekte und die im Karzinom gefundene NF κ B-abhängige Blockierung der Entzündungsreaktion lassen PPAR- γ -Agonisten als Medikament in der Antitumorthherapie als (Neo-) Angiogenesehemmer in Betracht kommen (Keshamouni *et al.*, 2005).

Im Folgenden soll die Differenzierung zu glatten Muskelzellen diskutiert werden, welche im Rahmen der murinen Embryogenese an Tag 9 einsetzt (McHugh *et al.*, 1995). Wie bereits gezeigt und diskutiert (siehe Abb. 5-1), beginnt die Synthese des α -SMA an Tag 6 in der *in vitro*-Kultur mit einem Maximum an Tag 12 (Clément *et al.*, 2006), woran wir unseren weiteren zeitlichen Versuchsaufbau orientierten. Allerdings lässt sich durch unsere Untersuchung keine spezifische Aussage über die Bildung von endothelialen VMSCs treffen, denn die detektierten α -SMA⁺-Zellen könnten auch an der Bildung der inneren Organe, des Urogenitalsystems, der Lymphgefäße und der Atemwege beteiligt sein (McHugh *et al.*, 1995). Derzeit gibt es aber auch keine wissenschaftliche Methodik, mit der es möglich wäre, selektiv VMSCs aus der EB-Kultur zu isolieren (Isayama *et al.*, 2013), daher wären Stimulationsexperimente mit einer VMSC-Zelllinie oder mit Hilfe von Versuchstieren zielführender. Nichtsdestotrotz argumentieren wir im Folgenden unsere Ergebnisse vornehmlich mit Bezug auf die Vaskulogenese, welche im Zentrum unserer Arbeit stand sollte. Interessanterweise verhält sich die Entwicklung der glatten Muskulatur konträr zu den beschriebenen Reaktionen der PPAR- γ -Agonisten bzw. -Antagonisten auf das Endothel. So induzierte CGZ die Differenzierung von mES-Zellen zu glatter Muskulatur, und andererseits führte die Antagonisierung von PPAR- γ zur Inhibition dieses Entwicklungsmusters (Abb. 5-6). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch vorhergehende Untersuchungen, in denen die Proliferation und Migration von VMSCs durch PPAR- γ -Agonisten inhibiert wurde (Yoshimoto *et al.*, 1999). Ebenso wurde im Tiermodell eine PPAR- γ -induzierte Reduktion der α -SMA-Expression gefunden, was mit einer Inhibition der VSMCs-Bildung und deren Proliferation einherging (Zhang *et al.*, 2010). Ein Grund für den detektierten Effekt von PPAR- γ auf diese Differenzierung könnte dessen Einfluss auf verschiedene Wachstumsfaktoren sein, denn die Entwicklung der vaskulären, glatten Muskulatur wird von diesen Faktoren initiiert, reguliert und moduliert (Jozkowicz *et al.*, 2000, Hellberg *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2013, Lien *et al.*, 2013). Zuerst soll die Interaktion der PPARs mit PDGF beschrieben und diskutiert werden (Hellberg *et al.*, 2010). Dieses Molekül wird in VMSCs von PPAR- γ über Proteinkinase G moduliert, wodurch die PPARs in Korrelation zu unseren Daten stark in deren zelluläre Prozesse und Differenzierung involviert sind (Yang *et al.*, 2013). Des Weiteren fanden Lien *et al.* (2013), dass “tissue growth factor”- β (TGF- β) die Entwicklung von SMCs aus mesenchymalen Zellen aktiviert heraus. Dieses wurde unter anderem durch regulatorische Effekte von PPAR- γ und PPAR- β/δ auf die Synthese von TGF- β zurückgeführt (Lien *et al.*, 2013). Ein schon während der Endothelentwicklung angesprochener Faktor ist VEGF, dessen Wirkung auf die glatte Muskulatur sehr kontrovers

diskutiert wird. Hier könnte die Pleiotropie der Aktivierung von PPAR die entscheidende Rolle spielen, da eine Abnahme des VEGF-Rezeptors in endothelialen Zellen durch den Anstieg der VEGF-Generierung in VSMCs oder Makrophagen begleitet wird (Jozkowicz *et al.*, 2000). Die direkte inhibitorische Wirkung von PPAR- γ auf die Expression und Synthese von VEGF ist hierbei noch nicht restlos erforscht und daher Gegenstand derzeitiger Forschung (He *et al.*, 2008).

Nichtsdestotrotz können unsere Daten lediglich auf die allgemeine Genese der glatten Muskulatur hindeuten. Um eine spezifische vaskuläre Entwicklung zu untersuchen, müssten weitere Experimente folgen. Dazu würden sich Stimulationsversuche mit PPAR- γ -Agonisten und -Antagonisten und einer VMSC-Zelllinie anbieten, wobei auch die angedeuteten Effekte auf die Wachstumsfaktoren studiert werden könnten.

5.3 Klinischer Aspekt & Ausblick

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die Haupttodesursache in der westlichen Welt, denn 2011 starben z. B. in Deutschland daran 398.529 Menschen (Schelo–Statistisches Bundesamt Deutschland, Pressemitteilung Nr. 425 vom 06.12.2012). Es ist bekannt, dass PPAR- γ durch die Modulation von Entzündungsreaktionen auf das kardiovaskuläre System wirkt, dennoch konnten die zugrundeliegenden Signalwege bisher nicht aufgespürt werden (Libby und Putzki, 2007; Ding *et al.*, 20114). Aufgrund ihrer Wirkung wurden PPAR- γ -Agonisten als Therapeutika gegen Artherosklerose, kardiovaskuläre Erkrankungen und Stoffwechselerkrankungen entwickelt, welche *in vitro* kardioprotektive Effekte dokumentierten (Wang *et al.*, 2003). Klinische Studien konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen, denn durch die Patientenbehandlung mit TZD wurden erhöhte Herzinsuffizienzraten verursacht (Marx *et al.*, 2001, Woollorton *et al.*, 2002). Unsere ermittelten Daten können diese *in vivo*-Untersuchungen auf molekularer Ebene ansatzweise erklären, denn die PPAR- γ -Agonisten inhibieren dosisabhängig die Differenzierung zu endothelialen und kardialen Zellen. Dennoch bleiben die PPARs im Fokus des wissenschaftlichen Interesses, v. a. aufgrund ihres Potentials zur Therapie von Arteriosklerose und Diabetes mellitus Typ II. Die Zukunft der PPAR-Agonisten liegt in einer pharmakologischen Weiterentwicklung der unterschiedlichen Isoformen, weil sowohl Verträglichkeit als auch Wirksamkeit verbessert werden müssen (Kendall *et al.*, 2006). Als Beispiel wäre Balaglitazon zu nennen, welches eine um 80 % reduzierte Affinität zu PPAR- γ

verglichen mit Rosiglitazon (RGZ) aufweist und eine bessere kardiovaskuläre Verträglichkeit bei gleichzeitig stabilem Blutzuckerspiegel zeigt (Pégorier *et al.*, 2005). Weitere Forschungen laufen in die Richtung eines ungesättigten *non*-TDZ-Derivats, z. B. PAT5A (Misra *et al.*, 2003). Diese *n*TDZpa (*non*-TDZ-PPAR- γ -Agonisten) sind potente selektive PPAR- γ -Modulatoren; sie zeigten im Mausmodell positive Effekte auf Hyperinsulinämie und -glykämie (Berger *et al.*, 2003, Misra *et al.*, 2003). Allerdings entwickeln die reinen PPAR- α und - γ -Agonisten Nebenwirkungen in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen, Ödembildungen und Nierenversagen (Nissen *et al.*, 2005). Daher liegt ein weiterer Forschungsschwerpunkt auf der Synthese von dualen α/γ -Agonisten, welche die positiven Effekte von PPAR- α auf den Fettstoffwechsel und von PPAR- γ als Insulinsensitizer verbinden (Kendall *et al.*, 2006). Diese potentiellen Medikamente würden wahrscheinlich auch die negativen Einflüsse auf das kardiovaskuläre System minimieren, wie wir in unserer Diskussion und unterstützt durch unsere Kollegen (Sharifpanah *et al.*, 2008) darstellen konnten (Abb. 5-4, Abb. 5-6). Außerdem könnte die CGZ-abhängige Blockierung des Endothelwachstums von Nutzen sein, indem mit TDZ-beschichtete Stents implantiert werden, was wahrscheinlich zu einem offenen Gefäßlumen in Koronararterien führen würde (Geng *et al.*, 2009).

5.4 Zusammenfassende Interpretation der gesetzten Zielstellungen

Aus den vorliegenden Ergebnissen und der darauf aufbauenden Diskussion schließen wir, dass ...

- 1.) ... der EB ein optimales *in vitro*-System zur Untersuchung der Differenzierung von mesodermalen Strukturen ist, da wir die endotheliale Differenzierung am Tag 5 -10 und am Tag 18 sowie die Entwicklung der glatten Muskulatur am Tag 10 -14 feststellen konnten,
- 2.) ... alle drei PPAR-Isotypen in CGR8 mES-Zellen nachweisbar sind und daher die Differenzierungsprozesse zu beeinflussen scheinen,
- 3.) ... die Konzentrationen von 10 μ M CGZ und GW9662 keine Apoptose einleiten und deswegen bedenkenlos in der EB-Kultur verwendet werden können,

- 4.) ... der PPAR- γ -Agonist CGZ auf die kardiale und endotheliale Differenzierung zwar antagonistisch wirkt, wohingegen eine verbesserte Entwicklung der glatten Muskulatur dokumentiert werden konnte (Abb. 5-7),
- 5.) ... der PPAR- γ -Antagonist GW9662 einen agonistischen Effekt auf die Kardiogenese und die Differenzierung des Endothels hatte, wohingegen er inhibierend auf die glatte Muskulatur wirkte (Abb. 5-7),
- 6.) ... CGZ sowohl die ROS-Generierung als auch die NO-Synthese inhibierte, wohingegen GW9662 die ROS-Bildung erhöhte und auf NO keinen Einfluss hatte. Wir schlussfolgerten, dass die PPAR-abhängige Regulation der ROS eine entscheidende Rolle während der kardialen Entwicklung spielt.

Letztendlich klärt die vorliegende Arbeit somit die zu Beginn als Ziele definierten Fragestellungen (siehe Kapitel 2) weitgehend auf. Zudem könnte durch den angesprochenen PPAR-*knock-down* ein weiterer Erkenntnisgewinn in Bezug auf die Kardiovaskulogenese erzielt werden. Dieser experimentelle Versuchsansatz bietet unserer Arbeitsgruppe gegenwärtig ein facettenreiches, intensives Betätigungsfeld.

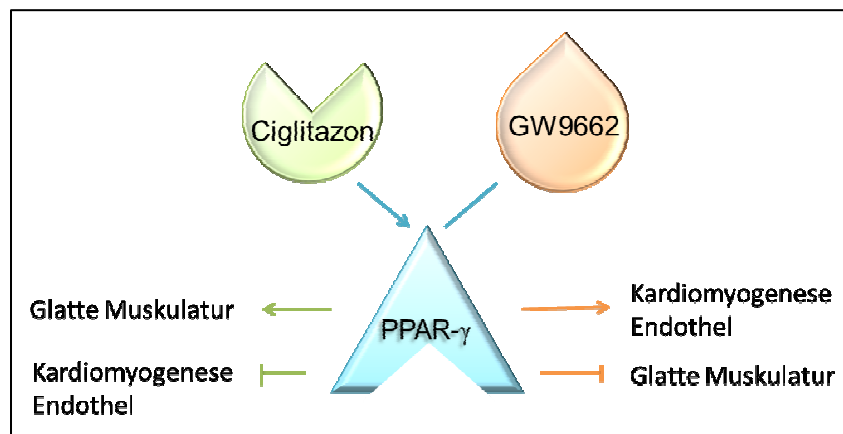


Abb. 5-7: Schematische Zusammenfassung, der aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse

6 Literaturverzeichnis

- Adams, M., Montague, C.T., Prins, J.B., Holder, J.C., Smith, S.A., Sanders, L., Digby, J.E., Sewter, C.P., Lazar, M.A., Chatterjee, V.K., 1997. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *Journal of Clinical Investigation*. 100:3149.
- Adler, S., Pellizzer, C., Hareng, L., Hartung, T., Bremer, S., 2007. First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells. *Toxicology in Vitro*. 22:200–211.
- Albelda, S.M., Oliver, P.D., Romer, L.H., Buck, C.A., 1990. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *The Journal of Cell Biology*. 110:1227–1237.
- Andrew, P.J., Mayer, B., 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*. 43:521–531.
- Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological reviews*. 81:1269–1304.
- Arzneimittelüberwachungsbehörde BfArM, 2010. 11/10 Rosiglitazon: Das BfArM ordnet VertriebsEinstellung an. Available at <http://www.bfarm.de/DE/BfArM/Presse/mitteil/2010/pm11-2010.html>.
- Asakawa, M., Takano, H., Nagai, T., Uozumi, H., Hasegawa, H., Kubota, N., Saito, T., Masuda, Y., Kadowaki, T., Komuro, I., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. *Circulation*. 105:1240–1246.
- Babior, B.M., 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 93:1464–1476.
- Babior, B.M., 2000. Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 109:33–44.
- Balfour, B.J.A., Plosker, G.L., 1999. Rosiglitazone. *Drugs*. 57-6:921–930.
- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., Evans, R.M., 1999. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular cell*. 4:585–595.
- Bartsch, C., Bekhite, M.M., Wolheim, A., Richter, M., Ruhe, C., Wissuwa, B., Marciniak, A., Müller, J., Heller, R., Figulla, H.-R., 2011. NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment. *Free Radical Biology and Medicine*. 51:432–443.
- Basson, C.T., Bachinsky, D.R., Lin, R.C., Levi, T., Elkins, J.A., Soult, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T.A., Leblanc-Straceski, J., 1997. Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature genetics*. 15:30–35.
- Beamer, B.A., Negri, C., Yen, C.-J., Gavrilova, O., Rumberger, J.M., Durcan, M.J., Yarnall, D.P., Hawkins, A.L., et al., 1997. Chromosomal Localization and Partial Genomic Structure of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma (hPPAR-gamma) Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*:756–759.
- Berger, J., Bailey, P., Biswas, C., Cullinan, C.A., Doebber, T.W., Hayes, N.S., Saperstein, R., Smith, R.G., Leibowitz, M.D., 1996. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology*. 137:4189–4195.
- Berger, J., Moller, D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*. 53:409–435.
- Berger, J.P., Petro, A.E., Macnaul, K.L., Kelly, L.J., Zhang, B.B., Richards, K., Elbrecht, A., Johnson, B.A., Zhou, G., Doebber, T.W., 2003. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein gamma selective modulator. *Molecular Endocrinology*. 17:662–676.

- Berndt M**, 2013. Redox regulation of platelet adhesion. *Cardiovascular diseases*. 2:1.
- Bishop-Bailey, D.**, 2000. Peroxisome proliferator activated receptors in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*. 129:823–834.
- Bodles, A.M., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Peterson, C.A., McGehee, R.E., Rasouli, N., Wabitsch, M., Kern, P.A.**, 2006. Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue. *Journal of Lipid Research*. 47:2080–2088.
- Boveris, A., Chance, B.**, 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134:707–716.
- Braissant, O., Wahli, W.**, 1998. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α , - β , and - γ during Rat Embryonic Development. *Endocrinology*. 139:2748–2754.
- Bredt, D.S., Snyder, S.H.**, 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87:682–685.
24. **Bryan, N.S., Bian, K., Murad, F.**, 2009. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci.* 14:1–18.
- Buckingham, M., Meilhac, S., Zaffran, S.**, 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics*. 6:826–837.
- Buggisch, M., Ateghang, B., Ruhe, C., Strobel, C., Lange, S., Wartenberg, M., Sauer, H.**, 2007. Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Journal of cell science*. 120:885–894.
- Burmester, J.K., Wiese, R.J., Maeda, N., DeLuca, H.F.**, 1988. Structure and regulation of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85:9499–9502.
- Cai, C.-L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.-H., Pfaff, S.L., Chen, J., Evans, S.**, 2003. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental cell*. 5:877–889.
- Calnek, D.S., Mazzella, L., Roser, S., Roman, J., Hart, C.M.**, 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 23:52–57.
- Carmeliet, P., Jain, R.K.**, 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 407:249–257.
- Chang, A.Y., Wyse, B.M., Gilchrist, B.J., Peterson, T., Diani, A.R.**, 1983. Ciglitazone, a New Hypoglycemic Agent: I. Studies in ob/ob and db/db Mice, Diabetic Chinese Hamsters, and Normal and Streptozotocin-Diabetic Rats. *Diabetes*. 32:830–838.
- Chen, F., Harrison, L.E.**, 2005. Ciglitazone-induced cellular anti-proliferation increases p27^{kip1} protein levels through both increased transcriptional activity and inhibition of proteasome degradation. *Cellular signalling*. 17:809–816.
- Chen, T., Jin, X., Crawford, B.H., Cheng, H., Saafir, T.B., Wagner, M.B., Yuan, Z., Ding, G.**, 2012. Cardioprotection from oxidative stress in the newborn heart by activation of PPAR γ is mediated by catalase. *Free Radical Biology and Medicine*. 53:208–215.
- Chinetti, G., Fruchart, J., Staels, B.**, 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors with functions in the vascular wall. *Z Kardiol.* 3:125–32.
- Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.-C., Chapman, J., Najib, J., Staels, B.**, 1998. Activation of Proliferator-activated Receptors α and γ Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 273:25573–25580.
- Chinzei, R., Tanaka, Y., Shimizu Saito, K., Hara, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., Teramoto, K., Arii, S., Takase, K., Sato, C.**, 2002. Embryoid body cells derived from a

- mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology*. 36:22–29.
- Christgen, M., Winkens, W., Kreipe, H.**, 2014. Proliferationsbestimmung beim Mammakarzinom durch den immunhistochemischen Nachweis von Ki-67. *Pathologe*:1-7.
- Clément, S., Stouffs, M., Bettiol, E., Kampf, S., Krause, K.-H., Chaponnier, C., Jaconi, M.**, 2007. Expression and function of α -smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Journal of cell science*. 120:229–238.
- David, V., Martin, A., Lafage-Proust, M.-H., Malaval, L., Peyroche, S., Jones, D.B., Vico, L., Guignandon, A.**, 2007. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology*. 148:2553–2562.
- Denu, J.M., Tanner, K.G.**, 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*. 37:5633–5642.
- Desouza, C.V., Gerety, M., Hamel, F.G.**, 2009. Effects of a PPAR-gamma agonist, on growth factor and insulin stimulated endothelial cells. *Vascular pharmacology*. 51:162–168.
- Desvergne, B., Michalik, L., Wahli, W.**, 2006. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev*. 86:465–514.
- Desvergne, B., Wahli, W.**, 1999. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews*. 20:649–688.
- Ding, Y., Yang, K.D., Yang, Q.**, 2014. The Role of PPARdelta Signaling in the Cardiovascular System. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 121:451–473.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R.**, 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 87:27–45.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., Wahli, W.**, 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68:879–887.
- Evans, R.M.**, 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240:889–895.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H.**, 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 292:154–156.
- Everitt, H., Hu, M., Ajmo, J.M., Rogers, C.Q., Liang, X., Zhang, R., Yin, H., Choi, A., Bennett, E.S., You, M.**, 2013. Ethanol administration exacerbates the abnormalities in hepatic lipid oxidation in genetically obese mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 304:G38-G47.
- Fajas, L., Fruchart, J.-C., Auwerx, J.**, 1998. PPAR gamma3 mRNA: a distinct PPAR-gamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters*. 438:55–60.
- Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C.X., Porcher, C., Orkin, S., Choi, K.**, 2000. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development*. 127:1931–1941.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.-H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L.**, 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*. 16:4604–4613.
- Freedman, L.P.**, 1992. Anatomy of the Steroid Receptor Zinc Finger Region. *Endocr Rev*. 13:129–145.
- Fridovich, I.**, 1970. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 245:4053–4057.

- Gampe, R.T., Montana, V.G., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Willson, T.M., Xu, H.E.**, 2000. Asymmetry in the PPAR gamma/RXR alpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell*. 5:545–555.
- Geng, D.-f., Jin, D.-m., Wu, W., Wang, Z., Wang, J.-f.**, 2009. Effect of thiazolidinediones on in-stent restenosis in patients after coronary stenting: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*. 202:521–528. Available at <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915008003535?showall=true>.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U., Stein, H.**, 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*. 133:1710–1715.
- Giaginis, C., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A.**, 2007. Investigation of the lipophilic behaviour of some thiazolidinediones: Relationships with PPAR-gamma activity. *Journal of Chromatography B*. 857:181–187.
- Goetze, S., Bungenstock, A., Czupalla, C., Eilers, F., Stawowy, P., Kintscher, U., Spencer-Hänsch, C., Graf, K., Nürnberg, B., Law, R.E.**, 2002. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPAR gamma-ligands. *Hypertension*. 40:748–754.
- Goikoetxea, M.J., Beaumont, J., González, A., López, B., Querejeta, R., Larman, M., Díez, J.**, 2006. Altered cardiac expression of peroxisome proliferator-activated receptor-isoforms in patients with hypertensive heart disease. *Cardiovascular Research*. 69:899–907.
- Green, S.**, 1995. PPAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Receptor Mediated Mechanisms in Chemical Carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 333:101–109.
- Greene, M.E., Blumberg, B., McBride, O.W., Yi, H.F., Kronquist, K., Hsieh, L., Greene, G., Nimer, S.D.**, 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*:281–299.
- Gronemeyer, H., Laudet, V.**, 1995. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein profile*. 2:1173.
- Gronemeyer, H., Moras, D.**, 1995. Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature*. 375:190–191.
- Gryglewski, R.J., Palmer, R.M., Moncada, S.**, 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor.
- Hajri, T., Abumrad, N.A.**, 2002. Fatty acid transport across membranes: relevance to Nutrition and Metabolic Pathology1. *Annual Review of Nutrition*. Annu. Rev. Nutr. 22:383–415.
- Halama, T.**, 1999. Characterisation of VE-cadherin- and PECAM-1-function within the Adherens Junction complex of human endothelial cells. *Dissertation*. Wien.
- Halliwell, B., Whiteman, M.**, 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142:231–255.
- Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., Al-Benna, S., Berg, G., Dominiczak, A.F.**, 2002. NAD (P) H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*. 40:755–762.
- Han, S., Roman, J.**, 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anti-Cancer Drugs*. 18:237–244.
- Hannig, M., Figulla, H.-R., Sauer, H., Wartenberg, M.**, 2010. Control of leucocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14:303–312.

- Harris, S.G., Phipps, R.P.**, 2001. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 31:1098–1105.
- He, Q., Pang, R., Song, X., Chen, J., Chen, H., Chen, B., Hu, P., Chen, M.**, 2008. Rosiglitazone Suppresses the Growth and Invasiveness of SGC-7901 Gastric Cancer Cells and Angiogenesis In Vitro via PPAR Dependent and Independent Mechanisms. *PPAR Research.* 2008.
- Heinzel, B., John, M., Klatt, P., Bohme, E., Mayer, B.**, 1992. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 281:627–630.
- Hellberg, C., Ostman, A., Heldin, C.-H.**, 2010. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res.* 180:103–114.
- Hempel, S.L., Buettner, G.R., O'Malley, Y.Q., Wessels, D.A., Flaherty, D.M.**, 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine.* 27:146–159.
- Henderson, B.S., Cheatham, R.B.**, 2006. Methods for identifying drug pharmacology and toxicology. U.S. Patent Applications.
- Hescheler, J., Wartenberg, M., Fleischmann, B.K., Banach, K., Acker, H., Sauer, H.**, 2002. Embryonic stem cells as a model for the physiological analysis of the cardiovascular system. *Embryonic Stem Cells, Methods in Molecular Biology™*:169–187.
- Hidalgo, K., Rojas, I.G., Penissi, A.B., Rudolph, M.I.**, 2005. TNF α increases in vitro migration of human HPV18-positive SW756 cervical carcinoma cells. *Biocell.* 29:303–311.
- Honda, M., Hamazaki, T.S., Komazaki, S., Kagechika, H., Shudo, K., Asashima, M.**, 2005. RXR agonist enhances the differentiation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells in serum-free conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 333:1334–1340.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., Monk, M.**, 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature.* 326:292–295.
- Iida, M., Heike, T., Yoshimoto, M., Baba, S., Doi, H., Nakahata, T.**, 2005. Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation. *The FASEB Journal.* 19:371–378.
- Isayama, N., Matsumura, G., Yamazaki, K.**, 2013. Comparison of vascular smooth muscle cells in canine great vessels. *BMC veterinary research.* 9:54.
- Issemann, I., Green, S.**, 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990:645–650.
- Jakubowski, W., Bartosz, G.**, 2000. 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: What does it measure? *Cell Biology International.* 24:757–760.
- Jang, S.K., Wimmer, E.**, 1990. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes & Development.* 4:1560–1572.
- Jezierski, A., Swedani, A., Wang, L.**, 2007. Development of hematopoietic and endothelial cells from human embryonic stem cells: lessons from the studies using mouse as a model. *The Scientific World Journal.* 7:1950–1964.
- Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B.**, 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 391:82–86.
- Jozkowicz, A., Dulak, J., Piatkowska, E., Placha, W., Dembinska-Kiec, A.**, 2000. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma increase the generation of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells and in macrophages. *Acta Biochimica Polonica.* 47:1147.

- Jozkowicz, A., Dulak, J., Nigisch, A., Weigel, G., Sporn, E., Fügl, A., Huk, I.**, 2002. Ciglitazone, ligand of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , inhibits vascular endothelial growth factor activity. *Eur. Surg.* 34:127-130.
- Kappel, A., Röncke, V., Damert, A., Flamme, I., Risau, W., Breier, G.**, 1999. Identification of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-2 (Flk-1) Promoter/Enhancer Sequences Sufficient for Angioblast and Endothelial Cell-Specific Transcription in Transgenic Mice. *Blood.* 93:4284–4292.
- Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Tanaka, M., Izumo, S.**, 1998. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2. 5 homeodomain protein. *Circulation Research.* 82:936–946.
- Kastenholz, M.A., Pastor, M., Cruciani, G., Haaksma, E.E.J., Fox, T.**, 2000. GRID/CPCA: a new computational tool to design selective ligands. *Journal of medicinal chemistry.* 43:3033–3044.
- Kattman, S.J., Adler, E.D., Keller, G.M.**, 2007. Specification of Multipotential Cardiovascular Progenitor Cells During Embryonic Stem Cell Differentiation and Embryonic Development. *Trends Cardiovasc Med.* 17:240–246.
- Katz A**, 1992. The cardiac action potential. *Physiology of the Heart. New York, Raven Press:*p 438.
- Kendall, D.M., Rubin, C.J., Mohideen, P., Ledezine, J.-M., Belder, R., Gross, J., Norwood, P., O'Mahony, M., Sall, K., Sloan, G.**, 2006. Improvement of Glycemic Control, Triglycerides, and HDL Cholesterol Levels With Muraglitazar, a Dual (α/γ) Peroxisome Proliferator–Activated Receptor Activator, in Patients With Type 2 Diabetes Inadequately Controlled With Metformin Monotherapy A double-blind, randomized, pioglitazone-comparative study. *Diabetes Care.* 29:1016–1023.
- Keshamouni, V.G., Arenberg, D.A., Reddy, R.C., Newstead, M.J., Anthwal, S., Standiford, T.J.**, 2005. PPAR- γ activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+ CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia (New York, NY).* 7:294.
- Kimura, H., Esumi, H.**, 2003. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol.* 50(1):49-59.
- Kleger, A., Seufferlein, T., Malan, D., Tischendorf, M., Storch, A., Wolheim, A., Latz, S., Protze, S., Porzner, M., Proepper, C.**, 2010. Modulation of Calcium-Activated Potassium Channels Induces Cardiogenesis of Pluripotent Stem Cells and Enrichment of Pacemaker-Like Cells Clinical Perspective. *Circulation.* 122:1823–1836.
- Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Evans, R.M.**, 1994. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 91:7355–7359.
- Knethen, A. von, Brüne, B.**, 2003. PPAR [γ] an Important Regulator of Monocyte/Macrophage Function. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis.* 51:219–226.
- Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H.**, 1998. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo).*:46(2):373-5.
- Kopp, C.W., Minar, E., Steiner, S.**, 2004. Therapeutische Angiogenese bei peripher-arterieller Verschlusskrankheit. *Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology.* 11:79–83.
- Lämmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–685.
- Lange, S., Heger, J., Euler, G., Wartenberg, M., Piper, H.M., Sauer, H.**, 2009. Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell-derived

- endothelial cells by calcium-mediated generation of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*. 81:159–168.
- Law, R.E., Goetze, S., Xi, X.-P., Jackson, S., Kawano, Y., Demer, L., Fishbein, M.C., Meehan, W.P., Hsueh, W.A.**, 2000. Expression and function of PPAR γ in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 101:1311–1318.
- Lazar, M.**, 2005. PPAR gamma, 10 years later. New developments in metabolic syndrome. *Biochimie*. 87:9–13.
- Lea, M.A., Sura, M., Desbordes, C.**, 2004. Inhibition of cell proliferation by potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists and antagonists. *Anticancer Research*. 24:2765–2772.
- Leahy, A., Xiong, J.-W., Kuhnert, F., Stuhlmann, H.**, 1999. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J. Exp. Zool*. 284:67–81.
- Lee, C.-H., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W.A., Evans, R.M.**, 2003. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPAR δ . *Science*. 302:453–457.
- Leesnitzer, L.M., Parks, D.J., Bledsoe, R.K., Cobb, J.E., Collins, J.L., Consler, T.G., Davis, R.G., Hull-Ryde, E.A., Lenhard, J.M., Patel, L.**, 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 41:6640–6650.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., Kliewer, S.A.**, 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry*. 270:12953–12956.
- Li, H., Heilbronn, L.K., Hu, D., Poynten, A.M., Blackburn, M.A., Shirkhedkar, D.P., Kaplan, W.H., Kriketos, A.D., Ye, J., Chisholm, D.J.**, 2008. Islet1: A Potentially Important Role for an Islet Cell Gene in Visceral Fat. *Obesity*. 16:356–362.
- Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R.J., Yi, C.H., Gebuhr, T., Bullen, P.J., Robson, S.C., Strachan, T.**, 1997. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature genetics*. 15:21–29.
- Li, S.C., Wang, L., Jiang, H., Acevedo, J., Chang, A.C., Loudon, W.G.**, 2009. Stem cell engineering for treatment of heart diseases: potentials and challenges. *Cell Biology International*. 33:255–267.
- Liang, F., Wang, F., Zhang, S., Gardner, D.G.**, 2003. Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) α Agonists Inhibit Hypertrophy of Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Endocrinology*. 144:4187–4194.
- Libby, P., Plutzky, J.**, 2007. Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists. *The American journal of cardiology*. 99:27–40.
- Lien, S.-C., Wei, S.-Y., Chang, S.-F., Chang, M.D.-T., Chang, J.-Y., Chiu, J.-J.**, 2013. Activation of PPAR- α Induces Cell Cycle Arrest and Inhibits Transforming Growth Factor- β 1 Induction of Smooth Muscle Cell Phenotype in 10T1/2 Mesenchymal Cells. *Cellular signalling*.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.**, 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *methods*. 25:402–408.
- Lock, E.A., Mitchell, A.M., Elcombe, C.R.**, 1989. Biochemical Mechanisms of Induction of Hepatic Peroxisome Proliferation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:145–163.
- Marx, N.**, 2001. Sonderdruck: Medical Expert - Was leisten Glitazone? Takeda Plasma GmbH:17–27.

- Marx, N., Schönbeck, U., Lazar, M.A., Libby, P., Plutzky, J.,** 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*. 83:1097–1103.
- Matthaei, S., Stumvoll, M., Häring, H.-U.,** 2001. Thiazolidindione (Insulinsensitizer): Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. *Dtsch Arztebl International*. 98:A-912. Available at <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=26722>.
- McHugh, K.M.,** 1995. Molecular analysis of smooth muscle development in the mouse. *Dev. Dyn.* 204:278–290.
- Meissner, M., Stein, M., Urbich, C., Reisinger, K., Suske, G., Staels, B., Kaufmann, R., Gille, J.,** 2004. PPAR α activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1-dependent DNA binding and transactivation. *Circulation Research*. 94:324–332.
- Mendis, S., Puska, P., Norrving, B.,** 2011. Global Atlas Global Atlason cardiovascular disease prevention and control. Available at www.who.int.
- Millard, S., Yan, J., Nguyen, H., Pagano, M., Kiyokawa, H., Koff, A.,** 1997. Enhanced ribosomal association of p27^{Kip1} mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem*. 272:7093–7098.
- Misra, P., Chakrabarti, R., Vikramadithyan, R.K., Bolusu, G., Juluri, S., Hiriyani, J., Gershon, C., Rajjak, A., Kashireddy, P., Yu, S.,** 2003. PAT5A: a partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a potent antidiabetic thiazolidinedione yet weakly adipogenic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 306:763–771.
- Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., Mandarino, L.J., DeFronzo, R.A.,** 2002. Effect of Pioglitazone on Abdominal Fat Distribution and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:2784–2791.
- Möller, F.J., Zierau, O., Hertrampf, T., Bliedtner, A., Diel, P., Vollmer, G.,** 2009. Long-term effects of dietary isoflavones on uterine gene expression profiles. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 113:296–303. Available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096007600900048X>.
- Montezano, A.C., Amiri, F., Tostes, R.C., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L.,** 2007. Inhibitory effects of PPAR- γ on endothelin-1-induced inflammatory pathways in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *Journal of the American Society of Hypertension*. 1:150–160.
- Morales-Garcia, J.A., Luna-Medina, R., Alfaro-Cervello, C., Cortes-Canteli, M., Santos, A., Garcia-Verdugo, J.M., Perez-Castillo, A.,** 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands regulate neural stem cell proliferation and differentiation in vitro and in vivo. *Glia*. 59:293–307.
- Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G.E., Paterniti, J.R.,** 1997. Identification, Characterization, and Tissue Distribution of Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and Activation with Retinoid X Receptor Agonists and Antagonists. *Journal of Biological Chemistry*. 272:8071–8076.
- Murata, T., Hata, Y., Ishibashi, T., Kim, S., Hsueh, W.A., Law, R.E., Hinton, D.R.,** 2001. Response of Experimental Retinal Neovascularization to Thiazolidinediones. *Arch Ophthalmol*. 119:709–717.
- Nemer, M.,** 2008. Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Cardiovascular Pathology*. 17:48–54.
- Nichols, J., Evans, E.P., Smith, A.G.,** 1990. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*. 110:1341–1348.

- Nissen, S.E., Wolski, K., Topol, E.J., 2005.** Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA: the journal of the American Medical Association.* 294:2581–2586.
- Ogihara, T., Rakugi, H., Ikegami, H., Mikami, H., Masuo, K., 1995.** Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives. *American journal of hypertension.* 8:316–320.
- Palakurthi, S.S., Aktas, H., Grubisich, L.M., Mortensen, R.M., Halperin, J.A., 2001.** Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Research.* 61:6213–6218.
- Panigraphy, D., Huang, S., Kieran, M.W., Kaipainen, A., 2005.** PPAR γ as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Biology & Therapy.* 4:687–693.
- Pavlov, T.S., Levchenko, V., Karpushev, A.V., Vandewalle, A., Staruschenko, A., 2009.** Peroxisome proliferator-activated receptor γ antagonists decrease Na⁺ transport via the epithelial Na⁺ channel. *Molecular Pharmacology.* 76:1333–1340.
- Pégrier, J.-P. (Ed.), 2005.** Récepteurs PPAR et insulinosensibilité: nouveaux agonistes en développement. Elsevier.
- Peymani, M., Ghoochani, A., Ghaedi, K., Karamali, F., Karbalaie, K., Kiani-Esfahani, A., Rabiee, F., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., 2013.** Dual effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on embryonic stem cell self-renewal in presence and absence of leukemia inhibitory factor. *European Journal of Cell Biology.* 92:160–168.
- Piqueras, L., Reynolds, A.R., Hodivala-Dilke, K.M., Alfranca, A., Redondo, J.M., Hatae, T., Tanabe, T., Warner, T.D., Bishop-Bailey, D., 2007.** Activation of PPAR β/δ induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 27:63–69.
- Power, R.F., Mani, S.K., Codina, J., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1991.** Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science.* 254:1636–1639.
- Reitsma, S., Slaaf, D., Vink, H., van Zandvoort, M., oude Egbrink, M., 2007.** The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 454:345–359.
- Ren, L., Liu, N., Zhi, H., Li, Y., Li, Y., Tang, R., Sheng, Z., 2011.** Vasculoprotective effects of rosiglitazone through modulating renin-angiotensin system in vivo and vitro. *Cardiovasc Diabetol.* 10:1475–2840.
- Risau, W., 1997.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386:671–674.
- Risau, W., Flamme, I., 1995.** Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology:*73–91.
- Risau, W., Gautschi-Sova, P., Böhlen, P., 1988.** Endothelial cell growth factors in embryonic and adult chick brain are related to human acidic fibroblast growth factor. *The EMBO journal.* 7:959.
- Rizzo, G., Fiorucci, S., 2006.** PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Current opinion in pharmacology.* 6:421–427.
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H.-H., Hescheler, J., Wobus, A.M., 1994.** Muscle Cell Differentiation of Embryonic Stem Cells Reflects Myogenesis *in Vivo*: Developmentally Regulated Expression of Myogenic Determination Genes and Functional Expression of Ionic Currents. *Developmental Biology.* 164:87–101.
- Roks, A.J.M., Rodgers, K., Walther, T., 2011.** Effects of the renin angiotensin system on vasculogenesis-related progenitor cells. *Current opinion in pharmacology.* 11:162–174.
- Rosenson, R.S., Wright, R.S., Farkouh, M., Plutzky, J., 2012.** Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects. *American heart journal.*

- Rossi, F., Zatti, M.**, 1964. Biochemical aspects of phagocytosis in poly-morphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia*. 20:21–23.
- Rowan, B.G., Weigel, N.L., O'Malley, B.W.**, 2000. Phosphorylation of Steroid Receptor Coactivator-1. *Journal of Biological Chemistry*. 275:4475–4483.
- Sasaki, H., Tanahashi, M., Yukiue, H., Moiriyama, S., Kobayashi, Y., Nakashima, Y., Kaji, M., Kiriya, M., Fukai, I., Yamakawa, Y.**, 2002. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Lung cancer*. 36:71–76.
- Sassoon, D.A., Garner, I., Buckingham, M.**, 1988. Transcripts of alpha-cardiac and alpha-skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development*. 104:155–164.
- Satoh, H., Tsukamoto, K., Hashimoto, Y., Hashimoto, N., Togo, M., Hara, M., Maekawa, H., Isoo, N., Kimura, S., Watanabe, T.**, 1999. Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPAR γ on vascular endothelial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 254:757–763.
- Sauer, H., Wartenberg, M.**, 2008. Circulating Isoprostanes: Gate Keepers in the Route From Oxidative Stress to Vascular Dysfunction. *Circ Res*. 103:907–909.
- Schelo S.**, 2010. Pressemitteilung Nr. 425 vom 06.12.2012. Herz-/Kreislauferkrankungen nach wie vor häufigste Todesursache. Zweigstelle Bonn, http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2010/10/PD10__371__232,templateId=renderPrint.psml.
- Schiffrin, E.L.**, 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 288:H1037-H1043.
- Schlaefke, S., Enders, A.C.**, 1963. Observations on the fine structure of the rat blastocyst. *Journal of Anatomy*. 97:353.
- Seargent, J.M., Yates, E.A., Gill, J.H.**, 2004. GW9662, a potent antagonist of PPAR γ , inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone, independently of PPAR γ activation. *British Journal of Pharmacology*. 143:933–937.
- Seimandi, M., Lemaire, G., Pillon, A., Perrin, A., Carlavan, I., Voegel, J.J., Vignon, F., Nicolas, J.-C., Balaguer, P.**, 2005. Differential responses of PPAR α , PPAR δ , and PPAR γ reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Analytical biochemistry*. 344:8–15.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.-D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., Rossant, J.**, 1997. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*. 89:981–990.
- Shao, D., Rangwala, S.M., Bailey, S.T., Krakow, S.L., Reginato, M.J., Lazar, M.A.**, 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR- γ . *Nature*. 396:377–380.
- Sharifpanah, F., Wartenberg, M., Hannig, M., Piper, H.-M., Sauer, H.**, 2008. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonists Enhance Cardiomyogenesis of Mouse ES Cells by Utilization of a Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism. *STEM CELLS*. 26:64–71.
- Skalli, O., Pelte, M.F., Peclet, M.C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., Ravazzola, M., Orci, L.**, 1989. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 37:315–321.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D.**, 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336:688–690.

- Spiegelman, B.M.**, 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 47:507–514.
- Spielmann, H., Pohl, I., Doering, B., Liebsch, M., Moldenhauer, F.**, 1997. The embryonic stem cell test, an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicology*:119–127.
- Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebreton, M., Torra, I.P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J.-C.**, 1998. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature*. 393:790–793.
- Straatman, K.**, 2008. Wound healing assay. Available at <http://www.le.ac.uk/biochem/microscopy/pdf/Wound%20healing%20assay.pdf>.
- Tarrade, A., Schoonjans, K., Pavan, L., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., Evain-Brion, D., Fournier, T.**, 2001. PPAR-gamma/ RXR-alpha Heterodimers Control Human Trophoblast Invasion. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:5017–5024.
- Tian, J., Smith, A., Nechtman, J., Podolsky, R., Aggarwal, S., Snead, C., Kumar, S., Elgaish, M., Oishi, P., Göerlach, A.**, 2009. Effect of PPAR γ inhibition on pulmonary endothelial cell gene expression: gene profiling in pulmonary hypertension. *Physiological genomics*. 40:48–60.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., Spiegelman, B.M.**, 1994. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Development*. 8:1224–1234.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G.A., Thomazy, V.A., Evans, R.M.**, 1998. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93:241–252.
- Vamecq, J., Draye, J.P.**, 1988. Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays in biochemistry*. 24:115–225.
- Vittet, D., Prandini, M.-H., Berthier, R., Schweitzer, A., Martin-Sisteron, H., Uzan, G., Dejana, E.**, 1996. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*. 88:3424–3431.
- Wang, C.-H., Weisel, R.D., Liu, P.P., Fedak, P.W.M., Verma, S.**, 2003. Glitazones and Heart Failure Critical Appraisal for the Clinician. *Circulation*. 107:1350–1354.
- Wartenberg M., Günther J., Hescheler, J., Sauer, H.**, 1998. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest*:1301–1314.
- Watanabe, M., Inukai, K., Katagiri, H., Awata, T., Oka, Y., Katayama, S.**, 2003. Regulation of PPAR γ transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 300:429–436.
- White, M.F., Kahn, C.R.**, 1994. The insulin signaling system. *J. biol. Chem*. 269.
- Wiles, M.V., Keller, G.**, 1991. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*. 111:259–267.
- Willson TM, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Henke, B.R.**, 2000. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*.:4:527-50.
- Wobus, A., Boheler, K.**, 2005. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol. Rev*. 85:635–678.
- Wobus, A.M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M.-C., Rohwedel, J., Guanju, J., Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J., Franz, W.-M.**, 1997. Retinoic Acid Accelerates Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Differentiation and Enhances Development of Ventricular Cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 29:1525–1539.
- Wooltorton, E.**, 2002. Rosiglitazone (Avandia) and pioglitazone (Actos) and heart failure. *Canadian Medical Association Journal*. 166:219.

- Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., Gronemeyer, H., 1996. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Mol Biol.* 3:87–94.
- Xiao, H., Gu, Z., Wang, G., Zhao, T., 2013. The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1 α Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies. *International journal of medical sciences.* 10:1412.
- Xin, X., Yang, S., Kowalski, J., Gerritsen, M.E., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry.* 274:9116–9121.
- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Molecular cell.* 3:397–403.
- Xu, X.Q., Soo, S.Y., Sun, W., Zweigerdt, R., 2009. Global expression profile of highly enriched cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 27:2163–2174.
- Yamashita, D., Yamaguchi, T., Shimizu, M., Nakata, N., Hirose, F., Osumi, T., 2004. The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor γ is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes to Cells.* 9:1017–1029.
- Yang, H.-M., Kim, B.-K., Kim, J.-Y., Kwon, Y.-W., Jin, S., Lee, J.-E., Cho, H.-J., Lee, H.-Y., Kang, H.-J., Oh, B.-H., 2013. PPAR γ modulates vascular smooth muscle cell phenotype via a protein kinase G-dependent pathway and reduces neointimal hyperplasia after vascular injury. *Experimental & molecular medicine.* 45:e65.
- Yang, L., Soonpaa, M.H., Adler, E.D., Roepke, T.K., Kattman, S.J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G.W., Linden, R.M., 2008. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature.* 453:524–528.
- Yen, C.-J., Beamer, B.A., Negri, C., Silver, K., Brown, K.A., Yarnall, D.P., Burns, D.K., Roth, J., Shuldiner, A.R., 1997. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPAR γ) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 missense mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 241:270–274.
- Yoshikawa, T., Brkanac, Z., Dupont, B.R., Xing, G.-Q., Leach, R.J., Detera-Wadleigh, S.D., 1996. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21. 1–p21. 2. *Genomics.* 35:637–638.
- Yoshimoto, T., Naruse, M., Shizume, H., Naruse, K., Tanabe, A., Tanaka, M., Tago, K., Irie, K., Muraki, T., Demura, H., 1999. Vasculo-protective effects of insulin sensitizing agent pioglitazone in neointimal thickening and hypertensive vascular hypertrophy. *Atherosclerosis.* 145:333–340.
- Zarzuelo, M.J., Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Quintela, A.M., Romero, M., Sánchez, M., Zarzuelo, A., Tamargo, J., Pérez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2013. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- β activation in endothelin-dependent hypertension. *Cardiovascular Research.* 99:622–631.
- Zhang, L., Xie, P., Wang, J., Yang, Q., Fang, C., Zhou, S., Li, J., 2010. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. *J Biol Chem.* 285:13666–13677.
- Zhu, Y., Alvares, K., Huang, Q., Rao, M.S., Reddy, J.K., 1993. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *Journal of Biological Chemistry.* 268:26817.

7 Bildverzeichnis

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2002 Molecular Biology of the Cell. 4th ed.
New York Chapter 15: 841

- Jezierski, A., Swedani, A., Wang, L.,** 2007. Development of hematopoietic and endothelial cells from human embryonic stem cells: lessons from the studies using mouse as a model. *The Scientific World Journal*. 7:1950–1964
- Lam J., Moretti A., Laugwitz K. L.** 2009 Multipotent Progenitor Cells in Regenerative Cardiovascular Medicine *Pediatric Cardiology* 30: 5:690-698
- Kattman, S.J., Adler, E.D., Keller, G.M.,** 2007. Specification of Multipotential Cardiovascular Progenitor Cells During Embryonic Stem Cell Differentiation and Embryonic Development. *Trends Cardiovasc Med*. 17:240–246.
- Matthaei S., Stumvoll M Häring H-U** 2001 Thiazolidindione (Insulinsensitizer): Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 *Deutsches Ärzteblatt* 14:912-918 M,
- Syha Y,** 2005 Synthese und in vitro-pharmakologische Charakterisierung von dualen PPAR α/γ -Agonisten, EKI: DNB979340403, Frankfurt (Main), Univ., Diss., 2006
- Theiler, K.,** 1989. The house mouse: atlas of embryonic development. Springer-Verlag New York.
- Willson TM, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Henke, B.R.,** 2000. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.*:4:527-50.

Abb. 3-1 modifiziert aus:

- (1) <http://www.neolab.de/nshopartdetails.do?kgrpId=12347>
- (2) <http://www.integra-biosciences.de/Produkte/Zellkultur/CELLSPIN/4113/>
- (3) http://de.123rf.com/photo_8533916_rot-fl-ssigkeit-und-petrischale-in-einem-labor.html

Abb. 5-3 modifiziert aus:

- (1) <http://www.hoelzel.at/1100.html>
- (2) <http://www.kinderwunsch-insemination.info>
- (3) <http://www.lukashensel.de/biomain.php?biopage=morula>
- (4) <http://docmed.tv.vitanet.de/medizinforschung/stammzellforschung>
- (5) <http://www.embryology.ch/allemand/gnidation/etape02.html#adhesion>
- (6) <http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/allantois/>
- (7) <http://www.embryo.chronolab.com/placenta.htm>
- (8) <http://www.operation.de/lunge/>
- (9) http://www.thoneick.de/de/section_100301.php
- (10) http://www.diabetes-aktuell.com/j-hcs-diabetes1/index.php?option=com_content&view=article&id=144&Itemid=44 Copyright © PHOENIX Pharmahandel GmbH & Co KG
- (11) http://de.123rf.com/photo_5927718_digitale-abbildung-der-alveolen-in-farbe-hintergrund.html All rights reserved. © 09/30/2013 123RF Limited 2006-2013
- (12) Harrisons, Innere Medizin, 18. Auflage (Copyright ABW Wissenschaftsvertrag GmbH)

8 Material

8.1.1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Zellkulturflaschen 50 ml	Greiner Bio-one International AG, Essen,
PP-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-one International AG, Essen,
PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-one International AG, Essen,
24-Well-Kulturschale, steril	Greiner Bio-one International AG, Essen,
96-Well-Mikroplatte	Greiner Bio-one International AG, Essen,
Zellkultur Petrischalen 100x20, adhären	Greiner Bio-one International AG, Essen,
Zellkultur Petrischalen adhären, ø 40 x 11 mm	TPP®, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
ø 22 mm Deckgläschen	ThermoScientific, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Cryoröhrchen mit Innengewinde	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Multisicherheitsreaktionsgefäße 0,5 ml	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Multisicherheitsreaktionsgefäß 2,0 ml	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNA-/DNA-Isolierung	
QIAGEN RNeasy® Säulen	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN Qias shredder™	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
quantitative RT-PCR	
Strips of 4 tubes and caps	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
FACS-Messung	
Polystyren Röhrchen	Becton Dickenson GmbH, Heidelberg, Germany

8.1.2 Geräte

Mikroskope:

Konfokales Laser-
Scanning

Mikroskop, cLSM

Zeiss 510[®] Meta

Carl Zeiss AG, Oberkochen

Apotom Observer.Z1

Carl Zeiss AG, Oberkochen

TELAVAL31

Carl Zeiss AG, Oberkochen

Cell – Spin System:

CELLSPIN

IBS Integra Biosciences GmbH, Fernwald

Zentrifugen:

Zentrifuge EBA12

Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge Universal 30RF

Hettich, Tuttlingen

Allegra[™] 21 R Centrifuge

Beckman Coulter[™] GmbH, Krefeld

Brutschränke:

DH Autoflow, CO2 Air-Jacketed
Incubators, Typ BB 6220 CU

NuAire Inc., Plymouth, USA

Waagen:

Sartorius BP221S

Sartorius AG, Göttingen

Scout[™]

OHAUS[®] Corporation, USA

Wasserbad:

SUB36 Seriennr.: 1P0520002

Grant in the laboratory, Cambridge, England

Wasseraufbereitungsanlage:

Milli-Q Reference

Seriennr.: F9PN62966D

Millipore SAS, Molsheim, Frankreich

Ultraschall-Homogenisator:

SONOPULS, HD2070, Gerätetyp
LS5

Bandelin electronic, GmbH & Co. KG, Berlin

Heizblock:

Block Heater, Cat.nr.: SHT 100D

BIBBY Sterilin Ltd, Stuart Scientific,
Staffordshire, UK

Stromversorgung für Western

Blot:

PowerPac 300

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

SDS-Page:

mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
LAS 3000 I _R	Quansys Biosciences, Logan, Utah, USA
SanoDrop®, ND-1000	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt

RT-PCR:

Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf Research®, Eppendorf AG Hamburg
Rotor-Gene Q, incl. 72-Rotor	Qiagen GmbH, Hilden
Agagel Midi-Wide	Biometra, biomed. Analytik GmbH, Göttingen
Standard Power Pack P25	Biometra, biomed. Analytik GmbH, Göttingen
Mikrowelle – MICROMA	AEG GmbH, Berlin

Brenner:

Fireboy plus	INTEGRA, Biosciences, Ziezers, Schweiz
Gas-Kartusche mit Ventil, CV360, Butan	Campingaz®, Camping Gaz GmbH, Hungen-Inheiden

Durchflusszytometer:

FACSCalibur Seriennr.: E08 08	Becton Dickenson GmbH, Heidelberg
----------------------------------	-----------------------------------

Statistikprogramm:

SigmaPlot 12.0	SYSTAT Software GmbH, Erkrath
GraphPad InStat3	GraphPad InStat Software, Inc., La Jolla, USA

Analyseprogramm:

Quantity One®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GeneSnap	SynGene, A Division of Synoptics Ltd, Cambridge, UK
Genetools	SynGene, A Division of Synoptics Ltd, Cambridge, UK
LSM Image Examiner	Carl Zeiss AG, Jena
Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2.	Qiagen GmbH, Hilden
Magelan® Analyseprogramm	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

LAS 3000 I_R (Luminescence Image Analyse System 3000) Quansys Biosciences, Logan, Utah, USA

8.1.3 Substanzen

Zellkultur:

Basal Iscov Medium, ohne Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco´s PBS ohne Ca/Mg	PAA the cell culture company, Pasching, Österreich
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (D-MEM) 500 ml, 4,6 g/L Glucose, L-Glutamin, ohne Pyruvat,	GIBCO Products, Invitrogen Cooperation New York, USA
G-MEM (Glasgow minimal essential medium)	SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (D-MEM) 500 ml, 4,6 g/L Glucose, L-Glutamin, 25 mM HEPES, ohne Pyruvat	GIBCO Products, Invitrogen Cooperation New York, USA
L-Glutamin	PAA the cell culture company, Pasching, Österreich
NEA	PAA the cell culture company, Pasching, Österreich
LIF (ESGRO)	Chemicon GmbH, Schwalbach
Fetal bovine serum Chargennr.: 107K3395	SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München
2-Mercaptoethanol	SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München
Trypsin/EDTA 25 %	GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Immunhistochemie:	
Glycerin Rotipuran	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe
Triton X 100	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe
Milchpulver, 500 g Kaisers Glyceringelatine	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe The Merck Group KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe

Bradford-Bestimmung:

Bradford Reagent

SIGMA Life Science, München

Albumin Fraktion, $\geq 98\%$

Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe

Western Blot:

Methanol

Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe

PepstatinA

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Aprotinin

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Leupetrin

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Sodiumorthovanadat

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Phosphatase Inhibitor Cocktail

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

PMSF (Phenylmethansulfonyl-fluorid)

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Rotiphorese® Gel 40

Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe

Tris

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

SDS (Sodium Dodecylsulfat)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

APS (Ammoniumpersulfat)

Merck Chemicals, Darmstadt

TEMED

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Glycerol

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Harnstoff

Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe

Bromphenolblau

SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München

Tween®20

Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe

DTT (Dithiothreitol)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Protein Ladder, biotinyliert

Cell Signaling Technology, Frankfurt/M.

ECL Western blotting detection reagents and analysis system

GE healthcare, Amersham, UK

Protan®

Whatman GmbH, Dassel

Nitrocellulose Transfermembran

Dimethylsulphoxid (DMSO) HYBRI-MAX [®] , ≥99.7 %	SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München
Ethanol ≥99,8 % Rotipuran	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe
Glycerin ≥99,5 % Rotipuran	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe,
Stimulantien: Ciglitazon	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
GW9662	Santa Cruz biotechnology, Inc., Heidelberg
Trolox	SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, München
MK886	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
Färbesubstanzen: 2',7'-dichlordihydro- fluoresceindiacetat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dihydroethidium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DAF-FM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethidiumhomodimer-2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNA-Isolierung: Reverse Transkription System (100 Reaktionen)	Promega GmbH, Salzburg, Österreich
QIAshredder Säulen	Qiagen GmbH, Hilden
RNAeasy Mini Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden
cDNA-Synthese: Red Load Taq Master	Jena Bioscience, Jena
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ethidiumbromid	Carl Roth Laborbedarf GmbH, Karlsruhe
TBE 10x Puffer	Life technologies GmbH, Darmstadt, Gibco Cell Culture
RT-PCR: QuantiFast SYBR Green PCR	Qiagen GmbH, Hilden

8.1.4 Antikörper

Anti-CD31, rate anti-mouse, monoklonal	Chemicon International GmbH, Schwalbach,
Anti- α -Actinin (Sarcomeric) mouse anti-mouse, monoclonal	Sigma Aldrich, St.Louis,USA
Anti- α - <i>smooth muscle</i> -Aktin rabbit anti-mouse, polyclonal	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Anti-GAPDH rabbit anti-mouse, polyclonal	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Anti-biotin HRP-linked Antibody	Cell Signaling technologies, Frankfurt/M.
Anti rabbit IgG-HRP	Santa Cruz biotechnology, Inc., Heidelberg
Goat to rat pAB (HRP)	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Hoechst 33342	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Cy5-konjugierte IgG ,anti -rate	Chemicon International GmbH, Schwalbach
Cy5-konjugierte IgG, anti -rabbit	Chemicon International GmbH, Schwalbach
Cy3-konjugierte IgG, anti-rate	Chemicon, International GmbH, Schwalbach
Cy2-konjugierte IgG , anti-rate	Chemicon International GmbH, Schwalbach
Anti-p27 ^{Kip 1} (phospho S10) [EP233(2)Y], Rabbit anti mouse, monoclonal	Abcam Inc., Cambridge, MA. USA
Anti-Caspase 3, Rabbit anti mouse, polyclonal	Cell Signaling technologies, Frankfurt/M.
Anti-Cleaved Caspase 3 (Asp175), Rabbit anti -mouse, polyclonal	Cell Signaling technologies, Frankfurt/M.
Purified Mouse Anti-eNOS/NOS Typ III, mouse, monoclonal	BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA
Phospho eNOS Antibody . (Ser1177), rabbit, polyclonal	Cell Signaling technologies, Frankfurt/M.

8.1.5 Oligonukleotide

Zielgen	Nukleotidsequenz	Firma
<i>mPPAR-α</i> (129 bp)	<i>for.</i> 5'-GTGGCTGCTATAATTTGCTGTG-3' <i>rev.</i> 5'-GAAGGTGTCATCTGGATGGGT-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mPPAR-β/δ</i> (100 bp)	<i>for.</i> 5'-TTGAGCCCAAGTTCGAGTTTG-3' <i>rev.</i> 5'-CGGTCTCCACACAGAATGATG-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mPPAR-γ</i> (397 bp) Transkript2	<i>for.</i> 5'-CAGAGCATGGTGCCTTCGCTGAT-3' <i>rev.</i> 5'-TCCCCACAGACTCGGCACTCA-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mki67</i> (94 bp)	<i>for.</i> 5'-GAGCGGCGGCCAGAGCTAAC-3' <i>rev.</i> 5'-AGGGCGGAGAAGCCTCTCGG-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mhc n4</i> (546 bp)	<i>for.</i> 5'-GGAGTATCCCATGATGCGGAG-3' <i>rev.</i> 5'-GGCAGGAGAGGGCTCAATCCA-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mtbx5</i> (153 bp)	<i>for.</i> 5'-GGAGCCTGATTCCAAAGACA-3' <i>rev.</i> 5'-TTCAGCCACAGTTCACGTTC-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mnkx2.5</i> (107 bp)	<i>for.</i> 5'-CCACTCTCTGCTACCCACCT-3' <i>rev.</i> 5'-CCAGGTTTCAGGATGTCTTTGA-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mis11</i> (174 bp)	<i>for.</i> 5'-ATGATGGTGGTTTACAGGCTAAC-3' <i>rev.</i> 5'-TCGATGCTACTTCACTGCCAG-3'	SIGMA Life Science, München
<i>mpol2a</i> (142 bp)	<i>for.</i> 5'-GACAAACTGGCTCCTCTGC-3' <i>rev.</i> 5'-GCTTGCCCTCTACATTCTGC-3'	SIGMA Life Science, München

8.1.6 Lösungen und Medien

β-Mercaptoethanol „working solution“

0,7 %	2-Mercaptoethanol
99,3 %	Steriles PBS

CGR8-LIF-Medium

87,95 %	G-MEM
10 %	inaktiviertes fetales Kälber Serum (SIGMA) filtriert
1 %	L-Glutamin
0,05 %	β-Mercaptoethanol „working solution“
1 %	LIF (10 ⁵ units/ml)

CGR8-Komplettmedium

77,4 %	Basal Iscove Medium
20 %	inaktiviertes fetales Kälber Serum (SIGMA) filtriert
0,1 %	β-Mercaptoethanol „working solution“
1,25 %	L-Glutamin
1,25 %	NEAA

CGR8-Einfriermedium

11,1 %	DMSO (Sigma)
88,9 %	CGR8-Komplettmedium

E14Tg2a.4-LIF-Medium

79,8 %	D-MEM (# 42430, Gibco)
17 %	Inaktiviertes FBS (Sigma)
1,176 %	NEAA
0,94 %	B-Mercaptoethanol (unverdünnt)
1,0 %	LIF (10^5 U/ml) \rightarrow 10^3 units/ml im Medium

E14Tg2a.4-Komplettmedium

81,19 %	D-MEM (# 42430, Gibco)
17,64 %	Inaktiviertes fetales Kälberserum (Sigma)
1,176 %	Non essential Amino acids
0,00094 %	β -Mercaptoethanol

E14Tg2a.4-Einfriemedium

61,2 %	Basal Iscove Medium
27,7 %	Inaktives FBS (Sigma)
11,1 %	DMSO

Feeder-Medium

77 %	D-MEM (Gibco)
18 %	Inaktives FBS (Sigma)
1,25 %	NEAA
1,25 %	L-Glutamin
1,25 %	β -Mercaptoethanol
1,25 %	Sodiumpyruvat

Trenngel	6 %	12 %
40 % Acrylamid	15 %	30 %
1,5 M Tris-HCl, pH8,8	25 %	25 %
10 % SDS	1 %	1 %
bidestilliertes Wasser	58 %	43 %
10% APS	1 %	1 %
TEMED	0,06 %	0,06 %

Sammelgel	3 %	4 %
40 % Acrylamid	15 %	20 %
1 M Tris-HCl, pH 6,8	25 %	25 %
10 % SDS	1 %	1 %
bidestilliertes Wasser	58 %	53 %
10 % APS	1 %	1 %
TEMED	0,06 %	0,06 %

SDS-Page Ladepuffer

0,5 M Tris, pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	2 ml
99 % Glycerol	1 ml
Harnstoff	3,6 g
Bromphenolblau	10 mg
DTT	500 mg
Bidestilliertes Wasser	10 ml

2 % Stripping-Buffer (Redetektionspuffer)

10 % SDS	2 %
1 M Tris-HCl, pH 8,0	6,25 mM
β -Mercaptoethanol	100 mM

HPI-Puffer**(Homogenisierungspuffer)**

HP-Puffer

1 M DTT (Endkonzentration 1 mM)

0,1 M PMSF (Endkonzentration 1 mM)

10 mg/ml Aprotinin
(Endkonzentration 10 µg/ml)0,5 mg/ml PepstatinA
(Endkonzentration 5 µg/ml)

5 mg/ml Leupeptin (Endkonzentration 25 µg/ml)

Natriumvanadat (Endkonzentration 1 mM)

Phosphatase Inhibitor Cocktail
(Endkonzentration 1 µl/ml)**HP-Puffer**

1 M Tris-HCl, pH 7,5 (Endkonzentration 20 mM)

10 % Triton X-100 (Endkonzentration 1 %)

0,1 M EDTA (Endkonzentration 1 mM)

Destilliertes Wasser

10x Transferpuffer (pH 8,3)

30,3 g Tris Base

144,0 g Glycine

20 % Methanol

5x Laufpuffer15,1 g/l (Endkonzentration 1 x Puffer 25 mM)
Tris72,0 g (Endkonzentration 1 x Puffer 200 mM)
Glycin10 % SDS-Lösung in H₂O (Endkonzentration 1x Puffer 0,1 % SDS)**Konzentrationen Ciglitazon**

50 mM	599 µl DMSO + 10 mg Ciglitazon
20 mM	750 µl DMSO + 10 mg Ciglitazon
10 mM	150 µl 20 mM Lsg. + 150 µl DMSO
1 mM	30 µl 10 mM Lsg. + 270 µl DMSO

Konzentration GW9662

10 mM	1,807 ml DMSO + 5 mg
2 mM	60 µl 10 mM Lsg. + 240 µl DMSO
1 mM	50 µl 2 mM Lsg. + 150 µl DMSO

E1-Puffer (1000 ml)

135 mM NaCl

5,4 mM KCl

1,8 mM CaCl₂1 mM MgCl₂ (98 %)

10 mM Glukose (99,5 %)

10 mM HEPES

Protease Inhibitor

1 mM Sodiumorthovanadat

1 % Phosphataseinhibitor-Cocktail

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich -Schiller -Universität Jena bekannt ist und dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Mich hat keine andere als Frau Prof. Dr. M. Wartenberg bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt. Die Hilfe eines Promotionsberaters nahm ich nicht in Anspruch und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit den Inhalten der vorgelegten Dissertation stehen. Ich habe diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, 28.04.2015

Ort, Datum



Constance Danzer

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Constance Danzer
Geboren am/ in: 22. Januar 1981/Jena

■ Werdegang

1987 – 1991	Besuch der Grundschule Camburg
1991 – 1997	Besuch der Staatl. Regelschule Camburg
1997 – 1999	Private Fachschule für Wirtschaft und Soziales Jena Abschluss: staatlich geprüfte Kosmetikerin
2000 – 2003	Staatliches Berufsbildendes Schulzentrum Jena Göschwitz Abschluss: Abitur
2003 – 2009	Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschluss: Diplom Biologin
2008 - 2009	Diplomarbeit im Plazentalabor der Frauenklinik Jena, Prof. Dr. med. U. Markert, Dr. rer. nat. T. Pöhlmann Thema: Analyse von Funktionen des ILT2-Rezeptors auf NK92-Zellen als Modell für deziduale NK-Zellen
2009 – 31.12.2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin Promotion: Uniklinikum Jena, KIM I/FZL, AG Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung, Frau Prof. M. Wartenberg/OA Dr. med. T. C. Pörner

Das ProChance 2013 -Programmlinie A2 Fördermaßnahme förderte die Arbeit zum Thema „Effekte von PPAR- γ Agonisten und Antagonisten auf die kardiovaskuläre Differenzierung in murinen embryonalen Stammzellen als in vitro Modell“ durch die Übernahme der Reisekosten von 390 €. Die FSU-Jena fördert die Qualifizierung von Wissenschaftlerinnen der FSU durch die Bereitstellung von Sachmitteln, welche den wissenschaftlichen Austausch und die Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen mit eigenem Fachbeitrag ermöglichen.

Wissenschaftliche Beiträge

- 2011 Effects of Rosiglitazon and Ciglitazon on endothelial cell and smooth muscle differentiation in ES-cell derived embryoid bodies, **Danzer C.**, Otto S., Poerner T., Figulla H.-R., Sauer H., Wartenberg M., Abstract number: P088, Acta Physiologica 2011; Volume 201, Supplement 682:P088, The 90th Annual Meeting of the German Physiological Society
- 2011 CIGLITAZON SELECTIVELY INHIBITS VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION IN MURINE EMBRYONIC STEM CELLS, Tudor C. Poerner, **Constance Danzer**, Sylvia Otto, Hans R. Figulla, Maria Wartenberg, 2011, Abstract, Journal of the American collage of cardiology, USA, New Orleans
- 2011 Ciglitazon Selectively Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Murine Embryonic Stem Cells, Tudor C. Poerner, **Constance Danzer**, Sylvia Otto, Hans R. Figulla, Maria Wartenberg, Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, P653, 2011
- 2011 A prospective randomised study using optical coherence tomography to assess endothelial coverage and neointimal proliferation at 6-months after implantation of a coronary everolimus-eluting stent compared with a bare metal stent postdilated with a paclitaxel-eluting balloon (OCTOPUS Trial): rationale, design and methods, Poerner TC, Otto S, Gassdorf J, Janiak F, **Danzer C**, Ferrari M, Figulla HR., Considerations, EuroIntervention, Paris
- 2012 Ethanol Treatment induces inflammatory-like processes in embryoid bodies derived from embryonic stem cells, **Danzer C.**, Redel J., Figulla H.-R., Sauer H., Wartenberg M., Abstract number: P087, Acta Physiologica 2012; Volume 204, Supplement 689:P087, The 91th Annual Meeting of the German Physiological Society
- 2013 PPAR- γ controls the cardiovascular differentiation in embryonic stem cells *in vitro*, **C. Danzer**, M. El Saied, A. Finkensieper, T.C. Pörner, H.-R. Figulla, H. Sauer, M. Wartenberg, Abstract Number: P029, Acta Physiologica 2013, The 92th Annual Meeting of the German Physiological Society

Publikationen in Vorbereitung:

Peroxisome proliferator activated receptor affect cardiovascular differentiation, Danzer C., Poerner T.C., Figulla H.R., Sauer H., Wartenberg M.

Effects of ethanol on embryonic stem cells, Danzer C., Leißner S., Redel J., Magnucki G., Figulla H.R., Sauer H., Wartenberg M.

Jena, den 28.04.2015

***„Es ist nicht genug zu wissen -man muss auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen -man muss auch tun.“***

-Johann Wolfgang Goethe (1749 -1832)-

Ich danke meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Maria Wartenberg und Herrn PD Dr. med. Tudor C. Pörner für die Finanzierung, Vergabe und Betreuung dieser Doktorarbeit sowie Herrn Prof. Dr. Claus Liebmann, welcher diese Arbeit in der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät vertreten hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. Thomas Braun für die Bereitstellung der E14Tg2a.4-Stammzellen bedanken. Einen besonderen Dank schulde ich Frau Dr. rer. nat. Madeleine Richter, Frau Dr. rer. nat. Marita Liebisch, Frau Dr. rer. nat. Christina Grosse, Herrn Dr. rer. nat. Robert Marquardt, Frau Dr. rer. nat. Carola Ruhe, Herrn Dr. rer. nat. Martin Förster, Frau Dipl.-Leb. Chem. Anne Wohlheim, Herrn Dr. rer. nat. Mohamed el Saied Bekhite, Herrn Dr. med. Andreas Finkensieper, Frau Martina Voigt, Frau Kirstin Hässler, Frau Heike Kersten, dem gesamten Forschungszentrum Lobeda, dem Forschungslabor der molekularen Kardiologie und Stammzellforschung sowie der Kardiologie KIM I der Uniklinik Jena und Herrn Dr. med. dent. Gabriel Magnucki für die vielseitigen Denkanstöße, hilfreichen Hinweise, Diskussionsbereitschaft und jegliche andere Unterstützung.

Weiterhin danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Lebensgefährten, welche mich fortwährend unterstützten und mir das Studium ermöglichten sowie für die große Geduld und das Interesse an dieser Arbeit.

